

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA SCHERAIBER

EFEITO DA INCLUSÃO DE IMUNOGLOBULINA Y NA SAÚDE SISTÊMICA E DO
TRATO GASTROINTESTINAL DE CÃES

CURITIBA

2018

MARIANA SCHERAIBER

EFEITO DA INCLUSÃO DE IMUNOGLOBULINA Y NA SAÚDE SISTÊMICA E DO
TRATO GASTROINTESTINAL DE CÃES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia, área de concentração em Fisiologia Animal Comparativa e dos Animais Domésticos, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Fisiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva.

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Scheraiber, Mariana

Efeito da inclusão de imunoglobulina y na saúde sistêmica e do trato gastrointestinal de cães. / Mariana Scheraiber. – Curitiba, 2018.
131 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Ana Vitória Fischer da Silva

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Cão. 2. Sistema gastrointestinal. 3. Fisiologia. I. Título II. Silva, Ana Vitoria Fischer da. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 591.1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **MARIANA SCHERAIBER** para fins de obter o título de Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer à aprovação (aprovação/reprovação) da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação, bem como do item III do artigo 80 da resolução 65/09 do CEPE-UFPR.

Curitiba, 16 de abril de 2018.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
Aprovada	Profa. Dra. Ananda Portella Felix UFPR - Membro Titular	AP Felix
Aprovada	Prof. Dr. Sebastião Aparecido Borges UTP - Membro Titular	
Aprovada	Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes UFPR - Membro Titular	
Aprovada	Profa. Dra. Elizabeth Santin UFPR - Membro Titular	Elizabeth Santin
Aprovada	Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva UFPR - Membro Titular	Ana Vitória Fischer da Silva



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 012/2015, referente ao projeto “Efeito da adição de ovo hiperimunizado na dieta sobre a saúde oral e do trato gastrointestinal de cães”, sob a responsabilidade de Ana Vitória Fischer da Silva, na forma em que foi apresentado (utilização de 44 animais e como grau B de invasividade), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - Brasil, em reunião realizada dia 13 de março de 2015.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 012/2015, regarding the project “Effect of addition hyperimmunized egg on diet about oral health and gastrointestinal tract of dogs”, under Ana Vitória Fischer da Silva supervision, in the terms it was presented (44 animals and was classified as grade B of invasiveness), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Brazil) during session on March 13, 2015.

Curitiba, 13 de Março de 2015.

Handwritten signature of Ananda Portella Félix.

Ananda Portella Félix
Presidente CEUA-SCA

Handwritten signature of Simone Tostes de Oliveira Stedile.

Simone Tostes de Oliveira Stedile
Vice-Presidente CEUA-SCA

Dedico:

Aos meus queridos companheiros, cães.

AGRADECIMENTOS

Ao realizar um trabalho de doutorado, por mais que a tese seja em um nome único, chegar até esta etapa após 4 anos de intenso estudo sem a ajuda e incentivo de muitas pessoas, não seria possível.

Inicio agradecendo à Deus pelo dom da vida e pelo amor aos animais. Agradeço pela oportunidade de sempre poder estudar e força para seguir em frente.

Aos meus queridos pais, Ciro e Linda, por serem meu alicerce, sempre me incentivarem nos estudos e em todas as etapas de minha vida.

Aos meus irmãos, Camila e Ciro Gustavo, pela amizade e companheirismo. Ao meu cunhado, Rafael, pela amizade e à minha sobrinha-afilhada, Isabela, por amar os cães assim como a tiadinda!

À querida professora, “mãe científica” e da vida, Dra. Ana Vitória Fischer da Silva, a qual sempre me apoiou em todas as decisões, caminhada pessoal e profissional.

Que bom seria se todos os professores, mestres e doutores fossem como você, sempre trabalhando com amor e preocupação com o aprendizado dos alunos. Minha forma de lecionar aulas e ensinar aos alunos são espelhadas em você!

Muito obrigada por todo o conhecimento compartilhado comigo, todas as conversas, conselhos, incentivos e apoio incondicional!

Ao professor Dr. Sebastião Aparecido Borges, obrigada por todas as conversas e sempre estar presente em todas etapas de minha vida!

Dra. Cacimar Teresinha de Castro Moraes, obrigada pela amizade pessoal e apoio fundamental em minha formação profissional. Sempre me auxiliando desde à graduação até os dias de hoje. Muito obrigada!

Agradeço também a todos os profissionais do Hospital Veterinário Ecoville pela prontidão no auxílio de uma etapa experimental, trabalhando sempre com muito comprometimento e amor pela Medicina Veterinária.

À professora Dra. Ananda Portella Félix, obrigada por sempre ensinar com um jeito ímpar e ajudar a todos. Fico feliz em saber que a ciência no Brasil tem profissionais como você. Com os avanços nas pesquisas, a cada dia poderemos proporcionar melhor nutrição e saúde aos nossos cães e gatos. Obrigada por compartilhar todo seu conhecimento durante a minha caminhada profissional.

Aos meus amigos do “Team Physiology”, Amanda Praça Bialli Drehmer Cruz, Suelen Cristina Soares Baal e Tiago Tedeschi dos Santos. Agradeço pelo intenso companheirismo, conversas e troca de conhecimentos em todo este período.

À minha querida amiga da fisiologia digestiva, Dra. Camila Aparecida Marques. Obrigada por todas as conversas, conselhos e amizade!

Aos queridos amigos, Renata Tissi Sezerban, Tatiane Aparecida Ramos, Jaime Luiz Alberti Filho, Pedro Gomes Giantomaso e Carolina Pedro Zanatta, muito obrigada por todo o apoio e companheirismo, sempre. Obrigada por todas as conversas e por estarem sempre presente em todas as etapas pessoais e profissionais de minha vida. À Tabyta T. Sabchuk, obrigada por compartilhar todo o conhecimento em pesquisa, nutrição de animais de companhia e amizade.

To my supervisor in Berlin, Professor Dr. Jürgen Zentek, “danke” for shared with me all your knowledge and expertise in animal nutrition, gastrointestinal physiology and veterinary medicine. I have no words to express my gratitude and honor to meet you and work with you! Thank you for receive me with your kind heart at Freie Universität Berlin and thank you for the great experience that I had at Institute of Animal Nutrition!

A special thanks to my co-supervisor and friend in Berlin, Dr. Łukasz Grzeskowiak. Obrigada por amar o Brasil assim como nós, por me fazer sentir em casa e por todo o companheirismo durante a minha estadia em Berlim. Obrigada por compartilhar comigo todo o seu conhecimento em microbiologia, pesquisa científica e amizade.

Dr. Beatriz Martinez Vallespin and Dr. Sara Altmeyer, thank you for all our lunch together and friendship in Berlin.

To all the staff at Freie Universität Berlin – Institut für Tierernährung, thank you! Marita Eitinger, Annet Kriesten, Dr. Wilfried Vajen, Dr. Nadine Paßlack, Britta Kluge and Corinna Schmidt. Thank you for shared all your experience with me!

To my friend from Egypt, Neveen Sheteiwy, thank you for your company in Berlin, all our talks and ice cream time together, thank you for the exchange of cultures between Brazil and Egypt!

Ao meu amigo Gabriel Faria Estivallet Pacheco, obrigada por todo o companheirismo nos cafés, passeios e estudos em Berlim!

Ich danke Berlin für all die Möglichkeiten und Erfahrungen, die diese wunderbare Stadt mir gegeben hat.

Ich danke meiner Deutschlehrerin Michelle Schulz Newton dafür, dass ich nach jedem Unterricht mich mehr in dieser wunderbaren Sprache verliebt habe.

Danke für alle!

Obrigada à Carolina Cini Perry por me abrir as portas da Grasp® e mostrar o trabalho sério e comprometido com a melhoria da saúde dos animais.

Obrigada, Fellipe Freitas Barbosa pela acolhida em Oldenburg e na EW Nutrition®. Agradeço por todo o esforço em me ajudar na realização do experimento, fazendo com que as análises laboratoriais em Berlim fossem possíveis!

À toda equipe da Nutripharme®, agradeço pelo companheirismo e pela acolhida nesta família maravilhosa!

Obrigada ao Médico Veterinário Especialista em Nutrição Animal, Cristiano Félix pela troca de informações, idealizações de experimentos, pela sempre prontidão

no atendimento, companheirismo em todos os congressos e divulgação dos produtos que tivemos oportunidade de criar e lançar no mercado.

À Andréa Prata e Anelise Costa Utescher, obrigada pela amizade e acolhida!

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Obrigada à toda a equipe do Hospital Veterinário Pompeia, em especial ao Dr. Fabiano Ponce, pelo entusiasmo, prontidão e pelo excelente trabalho dentro da UTI veterinária do HOVET Pompeia.

Por fim, agradeço àqueles que são os meus exemplos de amor, companheirismo e lealdade. Meus amigos, cães.

A cada um de vocês, peça fundamental em minha vida, agradeço pelos dias passados no canil experimental LENCAN – UFPR: Dumbo, Teddy, Zorro, Snoopy, Bidu, Pongo, Taz, Feliz, Duda, Chica, Lua, Nandinha, Lady, Fiona e Nariz. Amarula, Amora, Cacau, Paçoca, Bud, Cookie, Thor, Solução, Olívia, Tequila, Chanel, Babalu, Bexiga, Toddy, Scooby e Xuxo.

Aos cães em que tive oportunidade de atender no Hospital Veterinário Ecoville. Fico feliz em poder contribuir para a melhoria da saúde de vocês. Esse é o meu objetivo, vê-los a cada dia melhor e ao final, recebendo alta hospitalar.

E aos cães atendidos no Hospital Veterinário Pompeia, que a UTI seja somente uma passagem para a recuperação de diversas doenças!

“Lass die Nahrung Deine Medizin sein” Hippokrates (460-377 v.Chr.).

“Deixe o alimento ser seu remédio” Hipócrates (460-377 a.C.).

Muito obrigada!

*“Enquanto suspiramos por uma vida sem
dificuldades devemos nos lembrar que o carvalho
cresce forte através de ventos contrários e que os
diamantes são formados sob pressão”*

Peter Marshall

RESUMO

Imunoglobulinas Y (IgY) são os anticorpos produzidos em maior quantidade por galinhas poedeiras (*Gallus domesticus*). O uso de IgY na Medicina Veterinária é uma nova alternativa para a prevenção e tratamento de doenças específicas que podem afetar os cães, com isso, os benefícios desta suplementação na dieta e no tratamento convencional visam a melhoria da saúde gastrointestinal e sistêmica. O presente estudo objetivou avaliar a inclusão de IgY e os efeitos ocasionados em cães. Para tanto, foram realizados 4 experimentos: 1) Avaliação da inclusão de 0,4% de IgY na dieta seca extrusada para cães. Foi avaliado o efeito curativo da IgY em 14 cães Beagle anteriormente à profilaxia dentária e o efeito preventivo da IgY após a profilaxia dentária. Os animais foram divididos em 2 grupos – controle (0%IgY) e teste (0,4%IgY) e as avaliações de teor de *Porphyromonas gingivalis*, área de placa, e parâmetros clínicos (índice gengival, halitose, hipersalivação, espessura de cálculo, espessura de placa e profundidade de bolsa) foram realizadas. No experimento 1 – curativo, foi possível observar diminuição do teor de *Porphyromonas gingivalis* após 4 semanas no grupo em que recebeu a adição de IgY na dieta ($P<0,05$). A área de placa também diminuiu em cães do grupo IgY após 8 semanas ($P<0,05$). A inclusão de IgY diminuiu os níveis de índice gengival, halitose e espessura de cálculo na avaliação clínica após 8 semanas ($P<0,05$ e $P<0,10$). Já no experimento 2 – preventivo, a inclusão de IgY foi efetiva após 2 e 8 semanas em retardar o crescimento de placa bacteriana, mantendo os níveis de área de placa menores em comparação com o grupo controle ($P<0,05$). Os demais parâmetros avaliados não diferiram entre os grupos. 2) Avaliação da recuperação clínica de animais acometidos por Parvovirose com a inclusão de IgY ao tratamento convencional. Foi realizado um estudo duplo cego e os animais foram distribuídos de acordo com a rotina do hospital, cada cão como uma unidade experimental. Foram atendidos 12 cães e divididos em dois grupos: controle (comprimido placebo – ovo em pó, 1 comprimido a cada 10kg, QID) e teste (comprimido com IgY, 1 comprimido a cada 10kg, QID). Foram realizadas avaliações clínicas (temperatura corporal, escore fecal, anorexia, letargia, depressão, vômito e tosse), hemograma completo e taxa de óbito por 15 dias. Os animais do grupo teste obtiveram melhoras nos parâmetros clínicos de depressão e escore fecal após 3 dias do início do fornecimento da IgY ($P<0,05$). O escore fecal também se manteve melhor após 15 dias nos animais do grupo teste ($P<0,05$). Já os parâmetros hematológicos demonstraram níveis maiores de proteína plasmática e leucócitos nos animais do grupo controle, em comparação com os animais do grupo teste após 15 dias ($P<0,05$). No grupo teste não ocorreu óbitos, enquanto no grupo controle, um total de 3 animais obtiveram óbito. 3) Avaliação da recuperação clínica de pacientes em sepse com a inclusão de IgY ao tratamento convencional. Foram utilizados 54 cães divididos em dois grupos: controle (comprimido placebo – ovo em pó, 1 comprimido a cada 10kg a cada 4 horas) e teste (comprimido com IgY, 1 comprimido a cada 10kg a cada 4 horas). Os animais foram avaliados durante 24 horas por meio da mensuração de níveis séricos de glicose e lactato. O grupo controle apresentou aumento dos valores séricos de glicose após 2 e 12 horas de avaliação ($P<0,10$) em comparação ao grupo teste. Os níveis de lactato também se apresentaram elevados em pacientes do grupo controle ($P<0,10$). Durante o experimento, a taxa de óbito em animais do grupo controle foi de 7, enquanto no grupo teste não houve óbitos. 4) avaliação da microbiota fecal e seus metabólitos, produção de ácido siálico, digestibilidade da dieta e perfis hematológicos em cães saudáveis. Foram utilizados 16 cães da raça Beagle, com 11

meses de idade e divididos em delineamento inteiramente casualizado. Os cães foram separados em dois grupos – controle (0g/kg IgY) e teste (2g/kg IgY) – e os parâmetros hematológicos foram avaliados nos dias 0 e 40. Ao final de 40 dias, avaliações de coeficiente de digestibilidade, características fecais, produção de ácido siálico e composição da microbiota fecal, assim como seus metabólitos, foram avaliados. As fezes de animais pertencentes ao grupo teste apresentaram menor nível de ácido siálico e concentração de ácido valérico, enquanto a concentração de ácido butírico foi maior ($P<0,05$). Houve uma tendência no aumento do número de cópias de *Clostridium* cluster XIVa (*C. coccoides* grupo) nos animais do grupo teste ($P=0,07$). O pH fecal apresentou menores valores no grupo teste, quando comparado ao grupo controle ($P<0,05$). As outras bactérias analisadas, parâmetros hematológicos e coeficiente de digestibilidade não sofreram alterações com a inclusão de IgY. Com os resultados experimentais, é possível concluir que o uso de IgY para o auxílio do tratamento de doenças de cavidade oral e do trato gastrointestinal é viável.

Palavras-chave: Animais de companhia. Fisiologia gastrointestinal. Imunoglobulina. Saúde intestinal.

ABSTRACT

Immunoglobulins Y (IgY) are antibodies produced in large amount by laying hens (*Gallus domesticus*). The use of IgY in Veterinary Medicine is a new alternative for the prevention and treatment of specific diseases that can affect dogs, with which the benefits of this supplementation in the diet and conventional treatment aim the improvement of gastrointestinal and systemic health. The present study aimed to evaluate the inclusion of IgY and the effects on dogs. For this, 4 experiments were performed: 1) Evaluation of the inclusion of 0.4% of IgY in dry extruded diet for dogs. The curative effect of IgY was evaluated in 14 Beagle dogs prior to dental prophylaxis and the preventive effect of IgY after dental prophylaxis. The animals were divided into two groups: control (0% IgY) and test (0.4% IgY) and evaluations of *Porphyromonas gingivalis* content, plaque area and clinical parameters (gingival index, halitosis, hypersalivation, dental calculus and plaque thickness and pocket depth) were performed. In the experiment 1 – curative, it was possible to observe a decrease in the content of *Porphyromonas gingivalis* after 4 weeks in the group which received the addition of IgY in the diet ($P < 0.05$). After 8 weeks, the plaque area also decreased in dogs of the IgY group ($P < 0.05$). The inclusion of IgY decreased gingival index, halitosis and dental calculus thickness in the clinical evaluation after 8 weeks ($P < 0.05$ and $P < 0.10$). In experiment 2 – preventive, the inclusion of IgY was effective after 2 and 8 weeks in delaying the growth of bacterial plaque, maintaining lower plaque area levels compared to the control group ($P < 0.05$). The other parameters evaluated did not differ between groups. 2) Evaluation of the clinical recovery of animals affected by parvovirus with the inclusion of IgY to the conventional treatment. A double blind study was performed and the animals were distributed according to the hospital routine, each dog as an experimental unit. Twelve dogs were divided into two groups: control (placebo tablet – egg powder, 1 tablet per 10kg, QID) and test (tablet with IgY, 1 tablet per 10kg, QID). Clinical evaluations were performed (body temperature, fecal score, anorexia, lethargy, depression, vomiting and cough), complete blood count and death rate for 15 days. The animals in the test group showed improvement in the clinical parameters of depression and fecal score 3 days after receiving IgY ($P < 0.05$). The fecal score also remained better after 15 days in the test group ($P < 0.05$). On the other hand, hematological parameters demonstrated higher levels of plasma protein and leukocytes in the control group compared to the animals in the test group after 15 days ($P < 0.05$). In the test group, there were no deaths, whereas in the control group, three animals died. 3) Evaluation of clinical recovery of sepsis patients with inclusion of IgY to conventional treatment. 54 dogs were divided into two groups: control (placebo – egg powder tablet, 1 tablet every 10kg every 4 hours) and test (IgY tablet, 1 tablet every 10kg every 4 hours). The animals were evaluated for 24 hours for measurement of serum glucose and lactate levels. The control group presented increased serum glucose values after 2 and 12 hours of evaluation ($P < 0.10$) compared to the test group. Lactate levels were also elevated in patients in the control group ($P < 0.10$). During the experiment, the death rate in animals of the control group was seven, while in the test group there were no deaths. 4) Evaluation of fecal microbiota and its metabolites, production of sialic acid, diet digestibility and hematological profiles in healthy dogs. Sixteen 11-month-old Beagle dogs, divided in a completely randomized design, were used. The dogs were separated in two control groups (0g/kg IgY) and test (2g/kg IgY). Hematological parameters were evaluated on days 0 and 40. At the end of 40 days, evaluations of coefficient of digestibility, fecal characteristics, sialic acid production and

fecal microbiota composition, as well as their metabolites, were evaluated. The feces of animals belonging to the test group showed lower level of sialic acid and valeric acid concentration, while the butyric acid concentration was higher ($P<0.05$). There was a trend in increasing the number of copies of *Clostridium cluster XIVa* (*C. coccoides* group) in the animals of the test group ($P=0.07$). The fecal pH had lower values in the test group, when compared to the control group ($P<0.05$). The other bacteria analyzed, hematological parameters and digestibility coefficient did not change with inclusion of IgY. With the experimental results, it can be concluded that the use of IgY to aid in the treatment of oral cavity and gastrointestinal tract diseases is feasible.

Keywords: Companion animals. Gastrointestinal physiology. Immunoglobulins. Intestinal health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICAS DAS IMUNOGLOBULINAS SECRETADAS NOS MAMÍFEROS.....	27
FIGURA 2 – IMUNOGLOBULINA G E IMUNOGLOBULINA Y. V = DOMÍNIO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE (V_L) E DA CADEIA PESADA (V_H); C = DOMÍNIO CONSTANTE DA CADEIA LEVE (C_L) E DA CADEIA PESADA (C_H); HR = REGIÃO DE DOBRADIÇA. OS PONTOS PRETOS SIMBOLIZAM AS CADEIAS DE CARBOIDRATOS.....	28
FIGURA 3 – MODELO DE TRANSFERÊNCIA DE IgY NO SANGUE PARA A GEMA (YOLK) DURANTE A FORMAÇÃO DO OVO. IgA E IgM NO OVIDUTO SÃO DEPOSITADOS NA CLARA.....	29
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA GALINHA POEDEIRA RECEBENDO A ADMINISTRAÇÃO DE ANTÍGENO POR MEIO DE VACINA INTRAMUSCULAR E A TRANSFERÊNCIA DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS PARA A DEPOSIÇÃO NA GEMA DO OVO.....	30
FIGURA 5 – UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTÍGENOS PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS E SUAS POTENCIAIS APLICAÇÕES.....	33
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DA ARCADA DENTÁRIA DE UM CÃO ADULTO, VISTA LATERAL.....	35
FIGURA 7 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ESTRUTURAS ANATÔMICAS DO DENTE E PERIODONTO DE UM CÃO.....	36
FIGURA 8 – ESTÁGIOS DA DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES.....	37
FIGURA 9 – PLACA DE PETRI COM O CRESCIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i>	39

FIGURA 10 – PORCENTAGEM DE SEQUENCIA BACTERIANAS DE FILOS ENCONTRADAS EM AMOSTRAS DE SEIS CÃES (D1-D6), NO TEMPO 1 (DIA 1) E TEMPO 2, APÓS 15 DIAS.....	42
FIGURA 11 – MICRORGANISMOS PREDOMINANTES NO TRATO GASTROINTESTINAL DE CÃES, INCLUINDO PELE E TRATO UROGENITAL.....	43
FIGURA 12 – MECANISMO DE AÇÃO DA IgY NO TRATO GASTROINTESTINAL.....	45
FIGURA 13 – PORCENTAGEM DE SINAIS CLÍNICOS APRESENTADOS NOS DIFERENTES GRUPOS DE CÃES AFETADOS COM PARVOVÍRUS.....	46
FIGURA 14 – FOTOGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA CAVIDADE ORAL DE 2 CÃES (A, B) PARTICIPANTES DO EXPERIMENTO 1 MOSTRANDO O EFEITO CURATIVO DA IgY NA REMOÇÃO DO CÁLCULO DENTAL. OS MESMOS DENTES FORAM FOTOGRAFADOS NO DIA 0 E APÓS 8 SEMANAS DA INCLUSÃO DA DIETA COM IgY.....	65
FIGURA 15 – FOTOGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA CAVIDADE ORAL DE 2 CÃES (C, D) PARTICIPANTES DO EXPERIMENTO 2 MOSTRANDO O EFEITO PREVENTIVO DA IgY NA FORMAÇÃO DO CÁLCULO DENTAL. OS MESMOS DENTES FORAM FOTOGRAFADOS NO DIA 0 E APÓS 8 SEMANAS DA INCLUSÃO DA DIETA COM IgY.....	66
FIGURA 16 – MÉDIAS DE ÁREA DE PLACA EM CÃES SUPLEMENTADOS COM E SEM IgY, EFEITO CURATIVO – EXPERIMENTO 1 (A) E EFEITO PREVENTIVO – EXPERIMENTO 2 (B) AVALIADA EM 0, 2, 4, 6 E 8 SEMANAS.....	67
FIGURA 17 – TEOR DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> EM CÃES SUPLEMENTADOS COM IgY, EFEITO CURATIVO – EXPERIMENTO 1 (A) E EFEITO PREVENTIVO – EXPERIMENTO 2 (B) AVALIADO EM 0, 4 E 8 SEMANAS.....	67

FIGURA 18 – SNAP® PARVOVIROSE, COM RESULTADO POSITIVO REALIZADO NO HOSPITAL VETERINÁRIO ECOVILLE, EM PACIENTE PARTICIPANTE DO EXPERIMENTO.....	79
FIGURA 19 – ESTRUTURA DO ISOLAMENTO, LOCAL AONDE OS ANIMAIS PERMANECERAM INTERNADOS POR 3 DIAS.....	80
FIGURA 20 – ESCORES DE SINAIS CLÍNICOS AVALIADOS EM CÃES DO GRUPO TESTE (AI-G®) NOS DIAS 0, 3, 7 E 15.....	82
FIGURA 21 – ESCORES DE SINAIS CLÍNICOS AVALIADOS EM CÃES DO GRUPO CONTROLE NOS DIAS 0, 3, 7 E 15.....	82
FIGURA 22 – TAXA DE ÓBITOS NOS ANIMAIS DO GRUPO TESTE (AI-G®) E GRUPO CONTROLE, AO 0, 3, 7 E 15 DIAS.....	83
FIGURA 23 – IDADE DOS ANIMAIS ATENDIDOS NO HOVET POMPEIA.....	92
FIGURA 24 – RAÇAS DE CÃES ATENDIDOS NO HOVET POMPEIA.....	92
FIGURA 25 – NÚMERO DE ÓBITOS EM ANIMAIS QUE RECEBERAM SUPLEMENTAÇÃO COM IGY (AI-G®) E ANIMAIS QUE RECEBERAM O PLACEBO.....	93
FIGURE 26 – MEAN CONCENTRATION AND STANDARD DEVIATION OF SCFA (µMOL/G) PRESENT IN FECAL SAMPLES FROM BEAGLE DOGS RECEIVING PLACEBO (CONTROL GROUP) AND IGY (TREATMENT GROUP) FOR A PERIOD OF 40 DAYS AS ANALYZED BY GAS CHROMATOGRAPHY.....	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DA IMUNOGLOBULINA G DOS MAMÍFEROS E DA IMUNOGLOBULINA Y DE AVES.....	32
TABELA 2 – PONTUAÇÃO PARA MENSURAÇÃO DO ÍNDICE DE PLACA BACTERIANA E ÍNDICE DE CÁLCULO.....	60
TABELA 3 – PONTUAÇÃO PARA O ÍNDICE GENGIVAL, HALITOSE, HIPERSALIVAÇÃO E PROFUNDIDADE DE BOLSA.....	60
TABELA 4 – <i>PRIMERS</i> PARA A IDENTIFICAÇÃO E A QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE BACTERIANA TOTAL E DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL.....	63
TABELA 5 – MÉDIAS DOS PARÂMETROS CLÍNICOS AVALIADOS NAS SEMANAS 0, 2, 4, 6 E 8 ANTERIORMENTE À PROFILAXIA DENTÁRIA, NOS ANIMAIS PERTENCENTES AO GRUPO CONTROLE E GRUPO IgY (EXPERIMENTO 1).....	64
TABELA 6 – MÉDIAS DOS PARÂMETROS CLÍNICOS AVALIADOS NAS SEMANAS 0, 2, 4, 6 E 8 POSTERIORMENTE À PROFILAXIA DENTÁRIA, NOS ANIMAIS PERTENCENTES AO GRUPO CONTROLE E GRUPO IgY (EXPERIMENTO 2).....	64
TABELA 7 – ESCORES DE SINAIS CLÍNICOS PARA AVALIAÇÃO DE PACIENTE ACOMETIDO POR PARVOVIROSE.....	80
TABELA 8 – MÉDIA DO ESCORE DE SINAIS CLÍNICOS REFERENTES AOS DIAS 0, 3, 7 E 15 EM ANIMAIS DO GRUPO TESTE (AI-G®) E ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE.....	81
TABELA 9 – VALORES DAS MÉDIAS DE PARÂMETROS AVALIADOS NO HEMOGRAMA REFERENTE AOS DIAS 0 E 15 EM ANIMAIS DO GRUPO TESTE (AI-G®) E ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE.....	83

TABELA 10 – VALORES DE MÉDIAS DE GLICOSE (MG/DL) E LACTATO (MMOL/L) AVALIADOS NOS TEMPOS 0, 2, 6, 12 E 24 HORAS EM PACIENTES DO GRUPO TESTE (AI-G®) E PLACEBO (CONTROLE).....	94
TABLE 11 – INGREDIENTS AND ANALYZED CHEMICAL COMPOSITION (% NATURAL MATTER) OF COMPLETE FEED FOR DOGS.....	100
TABLE 12 – SEQUENCES OF PRIMERS USED IN QUANTITATIVE PCR AND THEIR ANNEALING TEMPERATURES.....	102
TABLE 13 – TARGET SPECIES OF PRIMERS PAIRS USED IN QUANTITATIVE PCR.....	104
TABLE 14 – BACTERIAL PREVALENCE PRESENTED AS PERCENTAGES (%) AND COUNTS (LOG ₁₀ COPY/G) PRESENTED AS MEDIAN WITH IQR IN FECAL SAMPLES FROM BEAGLE DOGS RECEIVING PLACEBO AND IgY AS ANALYZED BY qPCR.....	108
TABLE 15 – APPARENT FECAL DIGESTIBILITY (CDA, %), METABOLIZABLE ENERGY (ME, KCAL/KG) AND FEED INTAKE IN DOGS FED WITH IgY AND WITHOUT IgY (CONTROL GROUP) 40 DAYS AFTER RECEIVING THE DIETS....	110
TABLE 16 – FECAL SCORE, SIALIC ACID, PH AND NH ₃ OF THE DOGS FED THE DIETS WITH IgY AND WITHOUT IgY (CONTROL GROUP) 40 DAYS AFTER RECEIVING THE DIETS.....	110
TABLE 17 – ALT, ALP, CREATININE AND UREA ANALYZED ON DAYS 1 AND 40 IN ANIMALS WITHOUT IGY (CONTROL GROUP) AND WITH IgY.....	110
TABLE 18 – COMPLETE BLOOD COUNT (CBC) ON DAYS 1 AND 40 IN ANIMALS WITHOUT IGY (CONTROL GROUP) AND WITH IgY.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
Kg	Quilograma
TGI	Trato gastrointestinal
®	Produto registrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
3.1 IMUNOGLOBULINA Y.....	26
3.1.1 Estrutura molecular da IgY	27
3.1.2 Transferência da IgY do soro para o ovo	28
3.1.3 Vantagens na utilização de IgY	30
3.1.4 Aplicações práticas do uso de IgY	34
3.1.5 Uso de IgY na saúde oral	35
3.1.6 Uso de IgY na saúde intestinal.....	40
3.2 REFERÊNCIAS	46
4 INCLUSÃO DE IgY ANTI-<i>Porphyromonas gingivalis</i> NA SAÚDE ORAL DE CÃES ANTES E APÓS A PROFILAXIA DENTÁRIA.....	56
4.1 RESUMO.....	56
4.2 ABSTRACT	57
4.3 INTRODUÇÃO	57
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.4.1 Animais e instalações.....	58
4.4.2 Dietas	59
4.4.3 Avaliações clínicas	59
4.4.4 Avaliação computadorizada	61
4.4.5 Teor de <i>Porphyromonas gingivalis</i> quantificada por PCR em tempo real	61
4.4.5.1 Coleta das amostras e extração do DNA bacteriano total.....	61
4.4.5.2 Quantificação do DNA bacteriano total e de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	62
4.4.6 Análise estatística	63
4.5 RESULTADOS	63
4.5.1 Avaliações clínicas	63

4.5.2 Avaliação computadorizada	66
4.5.3 Teor de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	67
4.6 DISCUSSÃO	68
4.7 CONCLUSÃO.....	70
4.8 REFERÊNCIAS	70

5 APLICAÇÃO DIRETA DE OVO HIPERIMUNIZADO (AI-G®) COMO SUPORTE NO TRATAMENTO DE ANIMAIS ACOMETIDOS POR PARVOVÍRUS..... 75

5.1 RESUMO.....	75
5.2 ABSTRACT	75
5.3 INTRODUÇÃO	76
5.3.1 Parvovirose canina.....	76
5.3.2 Imunoglobulinas específicas da gema do ovo de galinhas.....	77
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	78
5.4.1 Delineamento experimental.....	78
5.4.2 Análise estatística	81
5.5 RESULTADOS	81
5.6 DISCUSSÃO	83
5.7 CONCLUSÃO.....	85
5.8 REFERÊNCIAS	86

6 AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES EM SEPSE ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO POMPEIA COM A INCLUSÃO DE IgY (AI-G®) AO TRATAMENTO CONVENCIONAL 89

6.1 RESUMO.....	89
6.2 ABSTRACT	89
6.3 INTRODUÇÃO	90
6.4 MATERIAL E MÉTODOS	91
6.4.1 Animais e instalações.....	91
6.4.2 Análise estatística	91
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
6.6 CONCLUSÃO.....	95
6.7 REFERÊNCIAS	95

7 INCLUSION OF SPECIFIC CHICKEN IgY IN DIET HAS MODERATE IMPACT ON THE INTESTINAL MICROBIAL FERMENTATION IN DOGS	97
7.1 RESUMO.....	97
7.2 ABSTRACT	98
7.3 INTRODUCTION	99
7.4 MATERIAL AND METHODS	100
7.4.1 Animals and facilities	100
7.4.2 Microbiota profile	101
7.4.3 Determination of microbial metabolites in fecal samples	105
7.4.4 Digestibility assay and fecal characteristics.....	105
7.4.5 Complete blood count and biochemical profiles	106
7.4.6 Statistical analysis	106
7.5 RESULTS.....	107
7.5.1 Microbiota profile and determination of microbial metabolites in fecal samples.....	107
7.5.2 Apparent fecal nutrient digestibility, fecal characteristics, sialic acid concentration, pH and ammonia nitrogen.....	109
7.5.3 Complete blood count and biochemical profiles	110
7.6 DISCUSSION	111
7.7 CONCLUSION	113
7.8 REFERENCES.....	114
 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 119
 REFERÊNCIAS.....	 120

1 INTRODUÇÃO

Segundo a ABINPET – Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação, a população de cães no Brasil em 2017 é de 52 milhões. Com isso, o mercado brasileiro de *pet food* aumentou consideravelmente nas últimas décadas, sendo o segundo maior mercado do mundo em produtos para animais de companhia e produção de alimento completo. Acrescentaram também os cuidados com a alimentação, higiene, tratamento, prevenção de doenças, e preocupação com a qualidade de vida dos animais.

Em consequência da grande população de animais de companhia, a indústria de nutrição de cães e gatos busca aprimorar as dietas e fornecer aos responsáveis, produtos de qualidade para seus animais. Alimentos industrializados completos e balanceados fornecem uma excelente qualidade nutricional, portanto, diversos aditivos e nutrientes são estudados para promover a fisiologia do organismo animal. Dentre os aditivos, as imunoglobulinas são fundamentais para contribuir na manutenção da saúde de cães.

As imunoglobulinas Y (IgY), anticorpos produzidos por galinhas poedeiras (*Gallus domesticus*), as quais são vacinadas contra antígenos específicos, são transferidos para a gema do ovo, onde são acumulados. O uso de IgY é uma nova alternativa para a prevenção e tratamento de doenças específicas que podem afetar os cães, ou seja, os benefícios desta suplementação na dieta e no tratamento convencional inclui o suporte do sistema imune em períodos críticos, melhoria da saúde oral de gengivas e dentes, gastrointestinal e sistêmica.

Estudos têm relatado que a IgY é eficiente na prevenção de doenças causadas por diversos patógenos (SUGITA-KONISHI et al., 1996). A saúde sistêmica e do trato gastrointestinal é de fundamental importância na vida do animal. Com a inclusão de IgY na dieta, e como suporte em tratamentos hospitalares, há uma melhora na saúde e diminuição da taxa de óbito.

Além de contribuir com a melhoria da saúde animal, a utilização da IgY também agrega uma série de vantagens em bem-estar animal e econômicas (KARLSSON et al., 2004). A obtenção de anticorpos provindos de galinhas poedeiras é um método não invasivo, baseado na simples coleta de ovos. Em contrapartida, para a obtenção de anticorpos de mamíferos, o soro deverá ser coletado por meio de punção venosa.

Além disso, o custo de produção de IgY é menor do que para anticorpos de mamíferos, pois a habitação de frango é barata e o processo/separação de anticorpo é econômico, com alto rendimento, simples e rápido (KARLSSON et al., 2004; SCHADE et al., 2005).

Com base na importância de promover a saúde de cães, o estudo teve objetivos traçados, os quais estão explanados, detalhadamente, na seção a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar o efeito da inclusão de IgY nas dietas convencionais de cães sobre a saúde geral e intestinal, assim como suplementação ao tratamento convencional de animais hospitalizados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito curativo e preventivo da IgY contra a principal bactéria causadora de doença periodontal em cães, *Porphyromonas gingivalis*. Com a inclusão da IgY, espera-se que ocorra a diminuição de halitose, área de placa bacteriana e cálculo dental, índice de placa bacteriana e cálculo, teor de *Porphyromonas gingivalis*, índice gengival, índice de hipersalivação e profundidade de bolsa periodontal.

- Avaliar o efeito da inclusão de IgY no tratamento convencional hospitalar em animais acometidos por Parvovírus, por meio de avaliações clínicas, como o tempo de alta hospitalar, avaliação de escore fecal, sinais clínicos e taxa de óbito.

- Com a inclusão de IgY juntamente ao tratamento convencional hospitalar em unidade de terapia intensiva, avaliar a recuperação clínica de pacientes em sepse por meio da mensuração de níveis séricos de glicose e lactato, assim como determinar a taxa de óbito.

- Traçar um perfil de microbiota fecal em cães saudáveis com a inclusão de IgY. Avaliar o efeito dos anticorpos IgY contra bactérias entéricas, assim como os produtos de fermentação de microbiota, produção de ácido siálico e digestibilidade da dieta.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 IMUNOGLOBULINA Y

Os linfócitos B e a sua contraparte madura, os plasmócitos, são tipos de células secretoras altamente especializadas cujos produtos são glicoproteínas, imunoglobulinas (Ig) ou anticorpos. As imunoglobulinas, também denominadas de anticorpos, referem-se às proteínas que conferem imunidade e, quando secretadas, reconhecem antígenos por meio de seus domínios variáveis (DIAS DA SILVA & TAMBOURGI, 2010). Podem ser monoclonais, quando são produzidos por um único clone de um único linfócito B parental, que é clonado e imortalizado, produzindo sempre os mesmos anticorpos, em resposta a um agente patogênico. Em contrapartida, as imunoglobulinas policlonais são derivados de diferentes linhagens de células B, ou seja, são uma mistura de moléculas secretadas contra um antígeno específico, cada um reconhecendo um epítopo diferente (ABBAS et al., 2013).

Atualmente disponíveis para pesquisa, diagnósticos e terapêutica, as imunoglobulinas de mamíferos monoclonais e policlonais são maioria. Tradicionalmente, animais como cavalos, ovelhas, suínos, coelhos e cobaias são utilizados para a produção de anticorpos policlonais, enquanto ratos são utilizados para a produção de anticorpos monoclonais (MICHAEL et al., 2010).

As imunoglobulinas são proteínas que atuam como componentes críticos em cada estágio da resposta imunológica humoral e cinco classes são reconhecidas em mamíferos: IgA, IgM, IgE, IgG e IgD (ALZARI et al., 1988) (figura 1).

Já em aves existem três classes de imunoglobulinas análogas as dos mamíferos, tais como: IgA, IgM e IgY (SUGITA-KINOSHI et al., 1996). IgA e IgM são homólogas à IgA e IgM de mamíferos, e possuem como funções, respectivamente: defesa das mucosas digestivas, brônquicas e do aparelho genitourinário; e defesa na circulação intravascular. Estas imunoglobulinas estão presentes apenas na clara do ovo, sendo indetectáveis na gema (CARLANDER; KOLLBERG; LARSSON, 2002). A IgY é funcionalmente equivalente a IgG de mamíferos, é a imunoglobulina predominante em aves, répteis e anfíbios (KARLSSON et al., 2004). Tem por atividade biológica capacidade de atravessar a placenta e as mucosas (ABBAS et al., 2013).

A utilização de imunoglobulinas é importante para promover a saúde do animal. A imunoglobulina Y utilizada na indústria como produto ovo em pó é um interessante

recurso de fonte de imunoglobulinas específicas de ovos naturais para imunoterapia do trato gastrointestinal (TGI). Possui uma vasta gama de aplicação, tais como: suporte do sistema imune em períodos críticos, aumenta a saúde intestinal e melhora a saúde oral de gengivas e dentes (EW NUTRITION, 2011). Muitas pesquisas têm reportado que a IgY é eficiente na prevenção de doenças causadas por diversos patógenos (SUGITA-KONISHI et al., 1996).

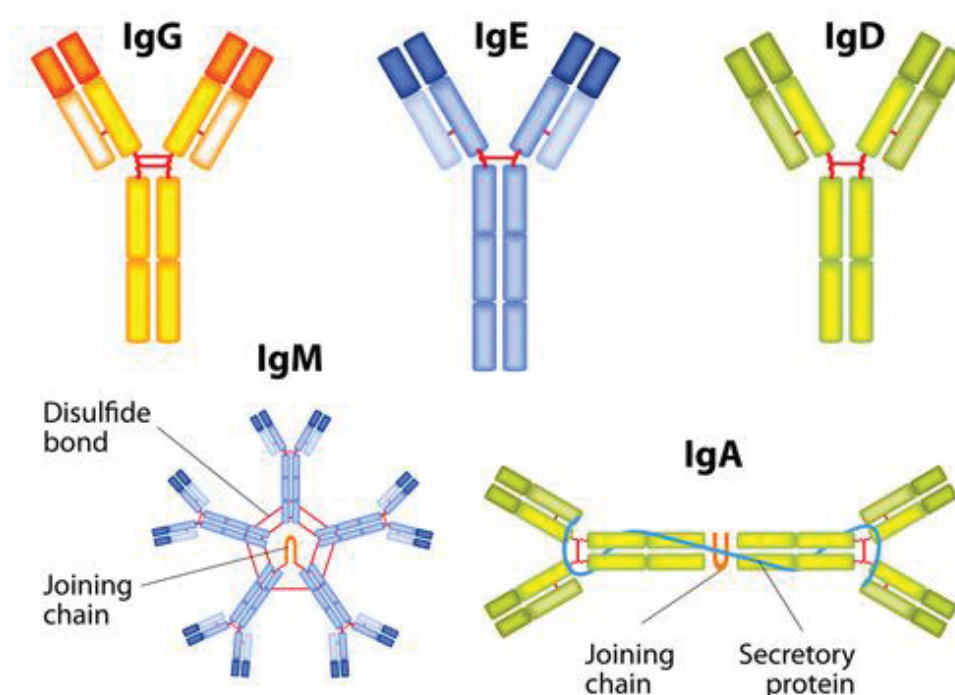


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICAS DAS IMUNOGLOBULINAS SECRETADAS NOS MAMÍFEROS. FONTE: ADAPTADO DE JOHNSON, 2013.

3.1.1 Estrutura molecular da IgY

A estrutura geral da IgY é semelhante à IgG de mamíferos (figura 2). Em sua estrutura, a IgY possui duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, mas possuem diferenças mais profundas, as quais incluem a massa molecular. A massa molecular da IgY é de 180kDa, enquanto a massa molecular da IgG é de 150kDa (KARLSSON et al., 2004). A cadeia pesada é indicada pela letra grega Y ou u, e contém um domínio variável (VL) e quatro domínios constantes (CL), em contraste com os três domínios constantes da cadeia pesada de IgG.

Existe homologia entre os domínios C_{H3} e C_{H4} e os domínios C_{H2} e C_{H3} da IgG de mamífero, enquanto acredita-se que o domínio C_{H2} representa a região espelho

da IgG e é muito menos desenvolvido em IgY (SHIMIZU et al., 1992). A região de dobradiça menos desenvolvida da IgY pode resultar em uma flexibilidade reduzida da fração Fab (a qual contém sítios de ligação ao antígeno), que, por sua vez, pode ser o motivo de algumas diferenças entre IgY e IgG em relação ao reconhecimento do epítipo de antígeno. Quanto à IgG, a região Fc (a qual possui domínios responsáveis por ativação do complemento, opsonização e sensibilização de mastócitos para reações anafiláticas (DIAS DA SILVA & TAMBOURGI, 2010) na IgY é o local da maioria das funções efetoras biológicas, e contém duas cadeias laterais de carboidratos, em contraste com apenas uma na IgG (SCHADE et al., 2005).

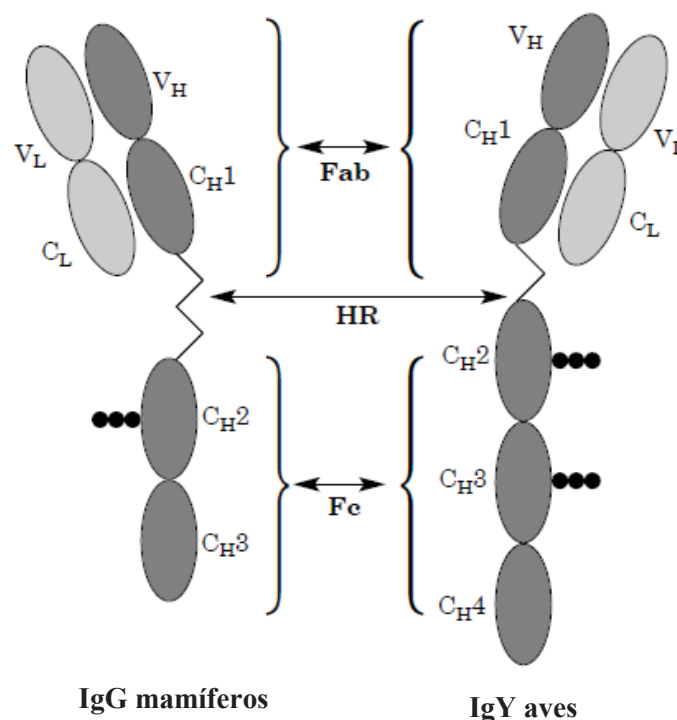


FIGURA 2 – IMUNOGLOBULINA G E IMUNOGLOBULINA Y. V = DOMÍNIO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE (V_L) E DA CADEIA PESADA (V_H); C = DOMÍNIO CONSTANTE DA CADEIA LEVE (C_L) E DA CADEIA PESADA (C_H); HR = REGIÃO DE DOBRADIÇA. OS PONTOS PRETOS SIMBOLIZAM AS CADEIAS DE CARBOIDRATOS. FONTE: ADAPTADO DE SCHADE ET AL., 2005.

3.1.2 Transferência da IgY do soro para o ovo

Em condições fisiológicas, a secreção de IgY nos pintos começa 6 dias após a eclosão do ovo. A IgY secretada pelas células B maduras é conduzida diretamente à circulação, atingindo uma concentração constante de 1,0-1,5 mg/ml de soro. Ao longo

da vida produtiva desta fêmea poedeira, a concentração sérica de IgY se mantém estável devido ao equilíbrio resultante dos processos contínuos de síntese e transferência desse anticorpo (DAVIES et al., 1995). A IgY armazenada na gema de ovo, no momento da incubação, é a fonte de anticorpos produzida pela galinha para proteger o pinto jovem nos primeiros dias após a incubação, conferindo imunidade passiva para os embriões e neonatos (DIAS DA SILVA & TAMBOURGI, 2010).

Em 1893, Felix Klemperer publicou o primeiro estudo resultante de seu trabalho com a neutralização de proteínas na gema de ovo. Neste trabalho, demonstrou que a imunização da galinha causou a transferência de anticorpos específicos para a gema do ovo, conferindo imunidade passiva para o embrião e neonato. Na fase de formação do ovo, a IgY é transferida para a gema por um processo mediado por receptor na superfície da membrana da gema específico para a translocação da IgY e as demais classes ficam depositadas na clara do ovo (TESAR et al., 2008) (figura 3), já a quantidade transferida é dependente da concentração sérica de anticorpo contra o antígeno específico (MORRISON et. al., 2002). Em adição, a quantidade de IgY transferida para o ovo é independente de seu tamanho (BOLLEN & HAU, 1997).

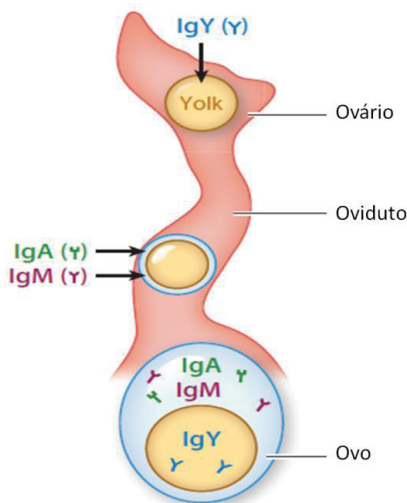


FIGURA 3 – MODELO DE TRANSFERÊNCIA DE IgY NO SANGUE PARA A GEMA (YOLK) DURANTE A FORMAÇÃO DO OVO. IgA E IgM NO OVIDUTO SÃO DEPOSITADOS NA CLARA. FONTE: ADAPTADO DE KOVACS-NOLAN & MINE, 2012.

O desenvolvimento e a produção de anticorpos como resultado da imunização não são muito previsíveis. Pelo menos quatro variáveis influenciam a resposta imune da galinha imunizada: o antígeno (dose e peso molecular), o tipo de adjuvante

utilizado, a via de aplicação e o animal em si (como manter as condições, idade, raça, capacidade de postura de ovos) (SCHADE et al., 2005).

As galinhas poedeiras são produtoras eficientes de anticorpos policlonais em comparação aos mamíferos. O processo de produção de anticorpos consiste em manter as galinhas poedeiras de 5 meses de idade isoladas de aviários convencionais, e imunizá-las para a produção de ovos imunologicamente estimulados. As galinhas são inoculadas com vacinas intramusculares no músculo peitoral (*pectoralis major*), contendo óleo adjuvante com antígeno. Oito semanas após a imunização inicial, uma imunização de reforço é administrada do mesmo modo. Duas semanas após a imunização de reforço, os ovos postos pelas galinhas imunizadas são colhidos e reunidos quando o título de anticorpo atinge o pico nas gemas (EW NUTRITION, 2011).

A seguir, a figura 4 demonstra esquematicamente a transferência da IgY para a gema do ovo.

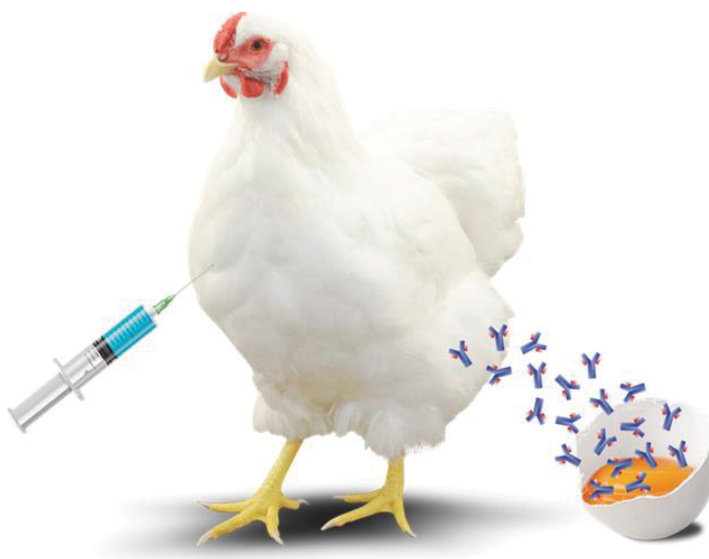


FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA GALINHA POEDEIRA RECEBENDO A ADMINISTRAÇÃO DE ANTÍGENO POR MEIO DE VACINA INTRAMUSCULAR E A TRANSFERÊNCIA DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS PARA A DEPOSIÇÃO NA GEMA DO OVO. FONTE: ADAPTADO DE Grasp®|EW Nutriton® & Nutripharme®.

3.1.3 Vantagens na utilização de IgY

A utilização de galinhas como hospedeiras de imunização traz uma série de vantagens para a produção de anticorpos (TINI et al., 2002). Os principais objetivos,

quando se realiza uma pesquisa científica, incluem o bem-estar animal e o princípio dos 3R's – reduzir, reutilizar e reciclar (RUSSEL & BURCH, 1959).

Com isso, a manipulação animal deve ser realizada de forma com que ocorra a redução na dor e sofrimento. A IgY preenche esses requerimentos, pois a obtenção de anticorpos provindos de galinhas poedeiras é um método não invasivo baseado na simples coleta de ovos. Em contrapartida, para a obtenção de anticorpos de mamíferos, o soro deverá ser coletado por meio de punção venosa (SCHADE et al., 2005).

Além do bem-estar animal, a utilização de IgY também agrega uma série de vantagens econômicas. O custo para a produção de IgY é menor do que para anticorpos de mamíferos, pois a habitação de frango é barata e o processo/separação do anticorpo é econômico, com alto rendimento, simples e rápido (KARLSSON et al., 2004). Além disso, a produção de anticorpos de uma galinha equivale aproximadamente à de um grande mamífero, como uma ovelha ou uma cabra. Assim, uma grande quantidade extraordinária de anticorpo pode ser produzida a partir de apenas uma galinha – aproximadamente 17 a 35g de IgY total/frango/ano, dos quais espera-se que 1 a 10% sejam específicos do antígeno. Esta enorme quantidade de anticorpos disponíveis abre portas para novos campos de aplicação para a tecnologia IgY, como na imunoterapia e na imunoprevenção para várias infecções virais e bacterianas, tanto na medicina humana, como na medicina veterinária (SCHADE et al., 2005).

Em adição à vantagem econômica, a IgY apresenta resistência à pH e temperatura extremas. IgY é estável em pH entre 4 a 9 e até 65°C em condições aquosas (SCHIMIZU et al., 1992), contudo, altas condições salinas ou adição de reagentes estabilizantes (açúcar) aumentam a resistência ao calor, pH extremamente ácido e alta pressão (SCHIMIZU et al., 1994; ZHANG, 2003; KARLSSON et al., 2004). Em testes de resistência à digestão com tripsina ou quimiotripsina, a IgY se mostrou resistente, porém, mais sensível à digestão com pepsina (OTANI et al., 1991).

Uma vez que existe uma distância filogenética entre frangos e mamíferos, a produção de anticorpos IgY contra antígenos conservados de mamíferos em geral é mais bem-sucedida em frangos do que em outros mamíferos (GASSMANN et al., 1990). Em adição, esses anticorpos são direcionados contra mais epítopos antigênicos e reconhecem as mesmas proteínas em várias espécies, tornando-as

mais amplamente úteis (TINI et al., 2002, ZHANG, 2003). A propagação evolutiva também significa que não há reatividade imunológica cruzada entre IgG de frango e IgG de mamífero, com isso, também é possível obter uma resposta imune forte com pequenas quantidades de antígeno em galinhas, reduzindo assim a quantidade de antígeno necessário para a produção de anticorpos (LARSSON et al., 1998; KARLSSON et al., 2004).

Em comparação com os anticorpos de mamíferos, as imunoglobulinas Y levam vantagem, pois não interage com os receptores Fc de mamíferos, o que poderia mediar respostas inflamatórias indesejáveis (DIAS DA SILVA & TAMBOURGI, 2010). A resposta imune das aves é persistente, induzindo altos títulos de IgY nas gemas das galinhas imunizadas por longo período (IKEMORI et al., 1993). De igual modo, as IgYs não reagem com IgG ou IgM e nem com componentes do sistema complemento de mamíferos. Dessa forma, não acarreta em reações cruzadas que poderiam resultar em falso-positivo nos imunoenaios e reduz a interferência dos fatores do complemento em alguns testes (CARLANDER et al., 2000; DINIZ, 2012).

A seguir, a tabela 1 demonstra a comparação e características da IgG e IgY.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DA IMUNOGLOBULINA G DOS MAMÍFEROS E DA IMUNOGLOBULINA Y DE AVES.

Itens comparados	IgG	IgY
Animal	Mamíferos	Aves, répteis e anfíbios
Fonte	Plasma sanguíneo	Gema do ovo
Amostra de anticorpo	Invasivo	Não invasivo
Quantidade de anticorpo	200mg/40ml de sangue	50-100mg/ovo 5-7 ovos/semana
Quantidade de anticorpo/mês	200mg	Aproximadamente 1000-2800mg
Reação cruzada	Reação com Ig de mamíferos e fatores do complemento	Não tem reação com Ig de mamíferos e nem com fatores de complemento
Isolamento	Remoção de vários componentes do plasma	Remoção de resíduos de lipídeos da gema
Estabilidade	pH 3-10, 70°C	pH 4-9, 65°C
Etapas que podem impor sofrimento ao animal	Inoculação do antígeno, coleta e transfusão de sangue	Inoculação do antígeno
Diagnóstico e terapêutica	Amplamente utilizado	Útil em várias aplicações; Alternativa a antibióticos

Fonte: Adaptado de Schade et al., 2005; Zhang, 2003.

A IgY tem sido utilizada em imunoenaios convencionais, como ELISA, western blot, imunoprecipitação, imunohistoquímica e marcação de células e tecidos (SCHADE & HLINAK, 1996). Além de melhor qualidade desses imunoenaios em comparação com os imunoenaios utilizando IgG, a IgY tem sido reportada em outras aplicações, como xenotransplante, diagnóstico e imunoterapia (KOVACS-NOLAN & MINE, 2012).

Para a produção de anticorpos específicos, a abordagem de anticorpos específicos de genes emprega vetores de expressão de genes para imunizar animais para a produção de anticorpos. Esta abordagem emprega imunização baseada em antígeno de DNA ou proteína em galinhas para gerar anticorpos IgY específicos de genes (figura 5).

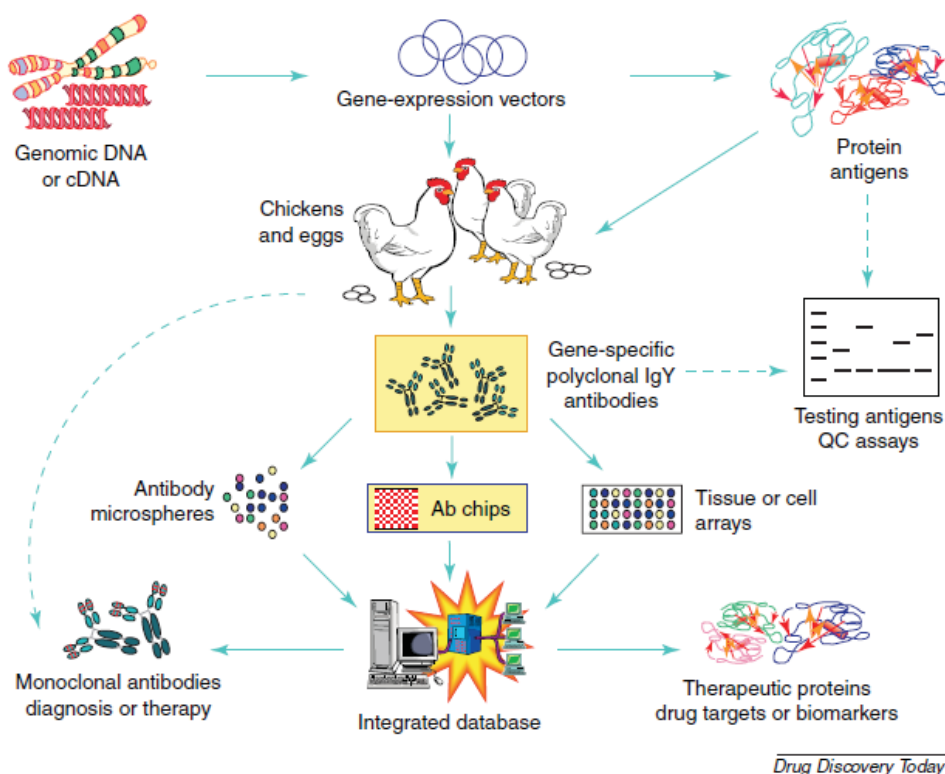


FIGURA 5 – UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTÍGENOS PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS E SUAS POTENCIAIS APLICAÇÕES. FONTE: ADAPTADO DE ZHANG, 2003.

Os anticorpos podem ser usados para identificação de proteínas desconhecidas em amostras de tecido ou células, por exemplo, através de matrizes de tecido, *chips* de anticorpos ou triagem de células. Este processo pode localizar alvos proteicos em tecidos ou células, determinar sua função potencial e analisar seus

perfis de expressão. Grandes quantidades de dados podem ser geradas e organizadas em um banco de dados integrado e relacional. As novas proteínas identificadas podem ser desenvolvidas como alvos ou agentes terapêuticos ou como marcadores de diagnóstico. Os anticorpos monoclonais ou terapêuticos também podem ser desenvolvidos adicionalmente com base no anticorpo IgY e na sua informação de antígeno alvo (ZHANG, 2003).

3.1.4 Aplicações práticas no uso de IgY

Embora seja um conceito relativamente novo, a imunização passiva por meio da administração oral de imunoglobulinas específicas tem sido estudada extensivamente e é uma abordagem atrativa para estabelecer imunidade passiva contra patógenos do trato gastrointestinal, tanto em humanos, como em animais (MINE & KOVACS-NOLAN, 2002).

A cada dia, com o uso indiscriminado de antibióticos na terapêutica, tem se aumentado a resistência de microrganismos, dificultando o sucesso do tratamento contra diversas doenças. De uma maneira comum, antibióticos foram utilizados na agricultura e na produção animal para a promoção do crescimento (doses sub-terapêuticas), prevenção de doenças (doses profiláticas) e para o tratamento (dose terapêutica) por mais de 50 anos. No entanto, o uso indevido de antibióticos na alimentação e terapêutica resultaram em complicações graves devido à resíduos de drogas em produtos de animais e aumento de resistência bacteriana (DIRAVIYAM et al., 2014).

Com isso, o uso de IgY como tratamento profilático e terapêutico tem sido uma alternativa cada vez mais viável e eficiente. Estudos demonstram que a IgY tem sido utilizada de forma eficiente em ensaios imunohistoquímicos para detecção viral e bacteriana de origem animal ou vegetal, assim como avaliar a incidência de parasitas intestinais em animais domésticos (SCHADE et al., 2005). A administração oral de IgY tem sido reportada como efetiva contra uma variedade de patógenos gastrointestinais, especialmente contra patógenos causadores de diarreia em diferentes animais, como rotavírus, coronavírus, *Escherichia coli* enteropatogênica (ETEC) e *Salmonella* spp. (XU et al., 2011; DIRAVIYAM et al., 2014).

Em um estudo recente, DA ROSA e colaboradores (2015) demonstraram a eficácia da utilização de IgY no controle de diarreia causada por *Escherichia coli*

(ETEC) F4 e F8 em leitões recém desmamados, confirmando a utilização da IgY como alternativa no uso de antibióticos na produção animal. Já em animais de companhia, os estudos com a inserção de IgY vêm avançando em cada ano. Pokorova et al. (2000) demonstraram a proteção de cães contra o parvovírus com a utilização de IgY, mecanismo de ação este explicado pela interação entre IgY e a superfície do vírus. Contudo, para demonstrar o mecanismo de ação e eficácia da IgY, estudos *in vitro* são importantes para consolidar a tecnologia. Sunwoo et al. (2002) demonstraram a inibição do crescimento de *Escherichia coli* 0157:H7 pela ação da IgY e mostraram que a inibição foi causada pela ligação da IgY aos antígenos de superfície bacteriana, o qual causou mudanças significativas na estrutura da superfície bacteriana. Outro efeito da ligação de IgY aos antígenos de superfície bacteriana é um comprometimento marcado da ligação bacteriana à mucosa intestinal (LEE et al., 2002). Assim, a administração terapêutica de IgY poderia reduzir o uso clínico de antibióticos, e assim, diminuir o risco de bactérias desenvolverem resistência à antibióticos (SCHADE et al., 2005).

3.1.5 Uso de IgY na saúde oral

Em cães e gatos é comum o aparecimento de patologias relacionadas a cavidade oral e, para entendê-las, é necessário o conhecimento anatômico da cavidade oral desses animais (figura 6).

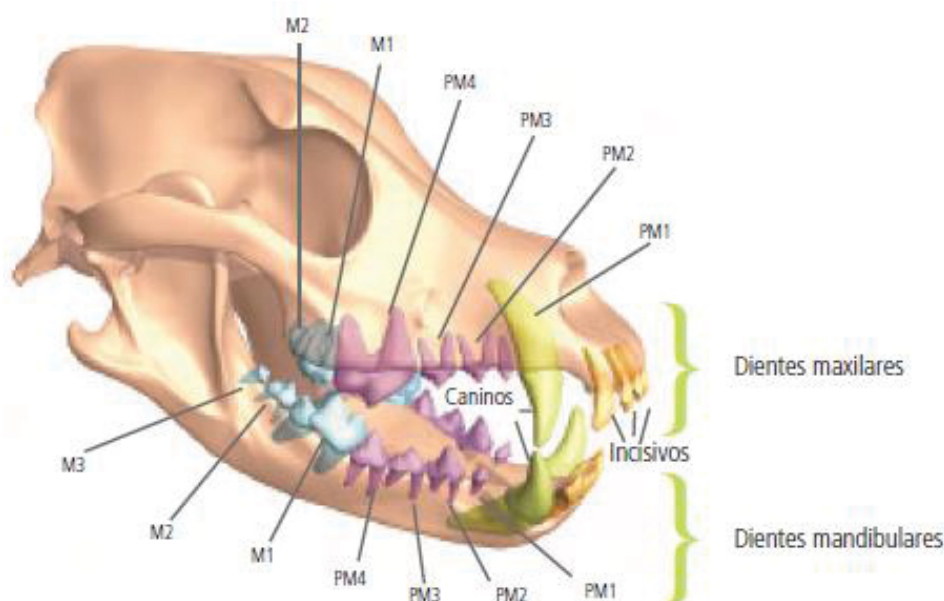


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DA ARCADA DENTÁRIA DE UM CÃO ADULTO, VISTA LATERAL. FONTE: HENNET, 2006.

Os cães possuem, em idade adulta, a totalidade de 42 dentes. A quantidade e classificação da dentição pode ser descrita pela fórmula dentária e a abreviatura representa cada tipo de dente (I = incisivos, C = caninos, PM = pré-molares, M = molares), seguida pela quantidade de dentes da categoria em um lado das arcadas superior e inferior. Dentes permanentes = $2 \times (I3/3 \ C1/1 \ PM4/4 \ M2/3) = 42$ (KÖNIG & LIEBICH, 2016).

A boca, por sua constituição e finalidade, está sujeita a diversos processos mórbidos primários ou secundários incluindo os traumatismos e as infecções bacterianas e virais, destacando-se dentre as alterações observadas na cavidade oral de cães e gatos as gengivites, periodontites, neoplasias, lesões de reabsorção, estomatites e cárie dentária (ABDALLA, 2008).

Dentre as doenças da cavidade oral, a doença periodontal, também denominada de periodontite, é provavelmente a doença infecciosa mais comum em medicina veterinária (RAHMAN et al., 2011). Esta patologia é causada pelo acúmulo de placa bacteriana sobre os dentes e estruturas adjacentes que o suportam, o periodonto, o qual é constituído por gengiva, osso alveolar, cemento e ligamento periodontal (GIOSO, 2007).

A figura 7, a seguir, demonstra as estruturas anatômicas, assim como a composição do dente e periodonto.

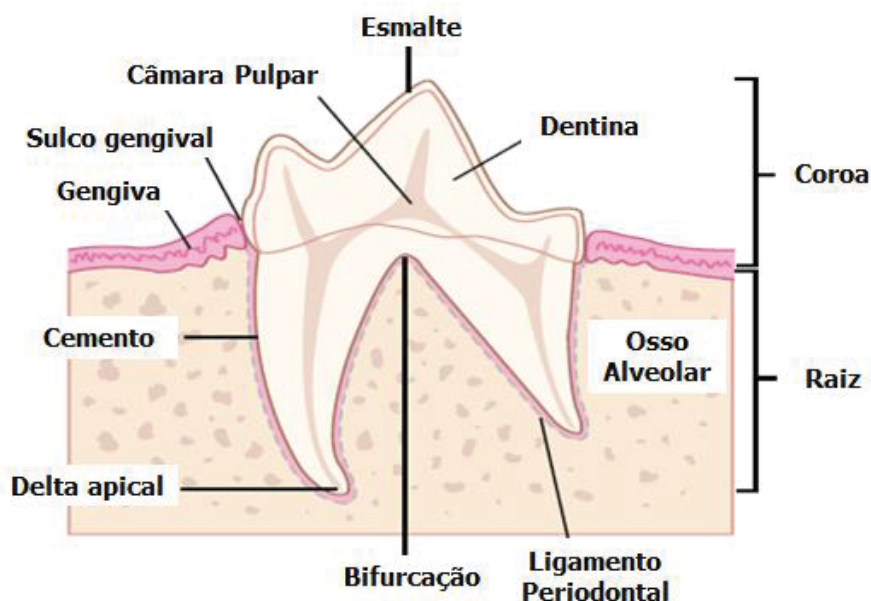


FIGURA 7 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ESTRUTURAS ANATÔMICAS DO DENTE E PERIODONTO DE UM CÃO. FONTE: ADAPTADO DE LOGAN ET AL., 2010.

Em pacientes susceptíveis, o acúmulo de placa bacteriana (biofilme formado pela agregação de bactérias, componentes salivares e células epiteliais) ao longo da superfície do dente e margem gengival induz a inflamação dos tecidos adjacentes. Sem remoção ou controle de placa, o quadro de gengivite evolui em gravidade para incluir mudanças locais que permitem colonização bacteriana subsequente de locais subgengivais. Os mediadores inflamatórios prejudicam a integridade da margem gengival e do epitélio adjacente, permitindo a infiltração adicional de bactérias (LOGAN, 2010), promoção de uma resposta imunológica e síntese de citocinas, as quais contribuem na degradação de tecido conjuntivo e perda óssea alveolar (ALI et al., 2011). Como consequência, há retração gengival, em que a gengiva se separa do dente ou do osso alveolar e formam as bolsas periodontais. Esse processo pode levar à osteólise, abscessos periodontais, fístulas oronasais e perda do dente (WHYTE et al., 2014).

A doença periodontal inclui 4 estágios, os quais são descritos na figura 8. A gengivite corresponde ao processo inicial da doença, que se não tratada, pode progredir para a periodontite. Essa, por sua vez, corresponde à inflamação com perda irreversível de sustentação do dente. Portanto, a gengivite acomete a gengiva, enquanto a periodontite envolve a unidade gengival e perdura após invadir a junção dento gengival, o ligamento periodontal, o cemento e o osso alveolar (TELHADO et al., 2004).

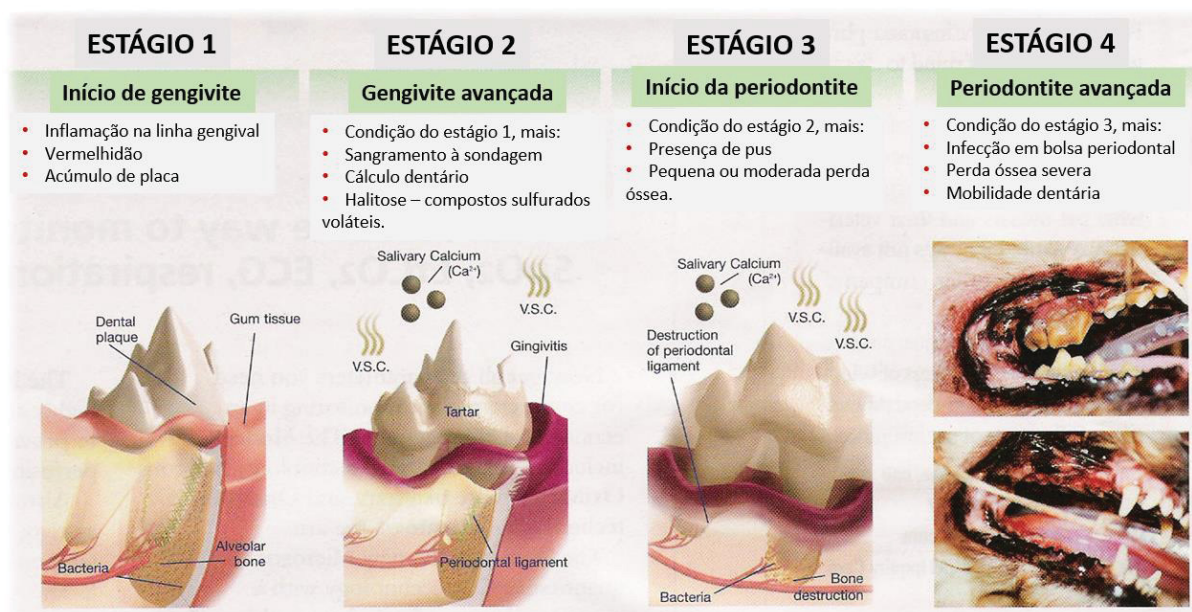


FIGURA 8 – ESTÁGIOS DA DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES. FONTE: ADAPTADO DE: <http://www.allcreatures.bz/post/does-my-pet-need-a-dental.html>.

A saúde bucal dos cães tem despertado crescente interesse pela indústria de alimentos e nutracêuticos para os *pets*. Segundo a *American Veterinary Dental Society* (AVDS, 2012), 80% dos cães e gatos apresentam doença periodontal a partir dos três anos de idade, sendo o problema de saúde mais comum relatado nas clínicas veterinárias em cães. Ainda, segundo a mesma instituição, além do incômodo causado aos donos pelo mau hálito de animais com problemas periodontais, as bactérias presentes na cavidade oral podem causar infecções em outros órgãos, como o fígado, rins e coração.

Com isso, nos últimos anos, houve uma acentuada expansão da oferta de produtos destinados a facilitar os cuidados dentários domésticos para os responsáveis e a ser mais toleráveis para os animais de estimação (GIOSO, 2003). Primeiramente, a estratégia foi estabelecer o efeito mecânico, ou seja, modificação da textura e do extrusado do alimento seco, biscoitos e *snacks* com formatos diferenciados para promover a mastigação do animal. Porém, esta estratégia somente atinge a superfície dos dentes utilizados no ato da mastigação (COX et al., 2003). Há também a utilização de fontes minerais nutricionais que podem proporcionar benefícios dentários como a diminuição da formação da placa bacteriana. Os fosfatos podem ser manipulados durante a fabricação do alimento seco para acentuar as propriedades físicas sem alterar as fórmulas de base ou tamanho do extrusado. Os cristais de polifosfatos ajudam a prevenir a mineralização da placa, pois formam uma barreira física em sua superfície, onde permanecem até que o organismo os absorva como nutrientes forforosos proporcionando, assim, benefício dentário prolongado (PAIVA et al., 2007).

Por fim, uma nova alternativa é a imunoterapia, em que a utilização de imunoglobulina provinda da gema do ovo de galinhas poedeiras (IgY) tem sido estudada para a diminuição dos níveis da bactéria *Porphyromonas gingivalis*, que, dentre outras bactérias presentes na cavidade oral, é a principal causadora da doença periodontal (SOCRANSKY et al., 1998).

Se o acúmulo da placa bacteriana não for controlado, ocorre a progressão da doença periodontal, em geral sem regeneração e incurável devido à resposta imunológica e inflamatória individual, resultando em destruição do periodonto, perda funcional e dentária, além de complicações sistêmicas devido à bacteremia e absorção de toxinas bacterianas oriundas da cavidade oral, que são relatadas como

alterações em coração, rins, fígado e articulações, o que remete para sua gravidade e importância (ABDALLA, 2008).

O conhecimento da microbiota da cavidade oral é fundamental para o tratamento contra a doença periodontal. Estudos demonstram que espécies de *Porphyromonas* e *Prevotella* têm sido isoladas da bolsa periodontal de cães com doença periodontal (GORREL & RAWLINGS, 1996; PERFECTO et al, 2011). Outras espécies também são identificadas em cães, como *Tannerella forsythensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Dialister pneumosintes*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* e *Treponema denticola* (ALLAKER et al., 1997). Em um estudo realizado por Nishiyama e colaboradores (2007), ao realizar a detecção de patógenos periodontais em amostras subgingivais de cães, a presença de *Porphyromonas gingivalis* foi detectada em 64% das amostras, seguida por *Campylobacter rectus*, encontrada em 36% das amostras.

A *Porphyromonas gingivalis* é bactéria gram-negativa anaeróbia, tem forma de bacilo, gera colônias escuras em ágar sangue devido à sua capacidade de atrair íon ferro do meio de cultura (TEIXEIRA et al., 2009) (figura 9) e tem sido identificada como um importante patógeno periodontal devido sua virulência (RAHMAN et al., 2011).



FIGURA 9 – PLACA DE PETRI COM O CRESCIMENTO DE COLÔNIAS DE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*. FONTE: PANDIT et al., 2015.

Muitos fatores de virulência têm sido associados com a patogenicidade da *Porphyromonas gingivalis*, incluindo lipopolissacarídeos, fímbrias, hemaglutininas, hemolisina e proteinases. As proteinases de superfície, que inclui a gingipaína,

também foram relatadas como sendo os principais fatores de virulência desta bactéria. A gingipaína, uma proteinase extracelular, desempenha um importante papel em relação à limpeza bacteriana, incluindo a captação de aminoácidos a partir de proteínas do hospedeiro, na aquisição heme de eritrócitos e na maturação de fímbrias (YOKOHAMA et al., 2007). Também tem capacidade de se expor na superfície (membrana externa) da bactéria, onde consegue entrar em contato com células e tecidos do hospedeiro, destruindo-os (PANDIT et al., 2015). O anticorpo IgY anti-gingipaína proveniente da gema do ovo de galinhas imunizadas contra a *Porphyromonas gingivalis*, inibe a atividade da enzima, o crescimento e a adesão desta bactéria às células epiteliais gengivais (RAHMAN et al., 2011).

Yokohama e colaboradores (2007) ao investigar o efeito do anticorpo proveniente da gema do ovo de galinhas anti-*Porphyromonas gingivalis* sobre a atividade da gingipaína *in vitro*, concluíram que na presença deste anticorpo, a gingipaína teve a sua atividade hidrolítica diminuída e as células incubadas com a gingipaína apresentaram uma perda dependente da dose da atividade de adesão. Ou seja, o tratamento com o anticorpo foi associado com uma forte inibição do desprendimento de células. Sendo assim, os resultados obtidos sugerem que o anticorpo IgY é um efetivo imunoterapêutico agente no tratamento de doenças periodontais.

3.1.6 Uso de IgY na saúde intestinal

O conceito de saúde do trato gastrointestinal (TGI) é complexo e amplamente definido. De acordo com Conway (1994) três componentes principais de saúde intestinal existem e incluem a dieta, mucosa intestinal e microbiota intestinal. Ou seja, alterações nutricionais, estresse, envelhecimento ou doença afeta a fisiologia do intestino, a absorção de nutrientes e especificamente o metabolismo (KUZMUK et.al., 2005).

O intestino de cães apresenta padrão de colonização microbiano semelhante ao de outros mamíferos. Ao nascimento o tubo digestível é estéril, sendo rapidamente colonizado por bactérias presentes no ambiente, principalmente obtidas pelo contato materno (PINNA & BIAGI, 2014). Uma vez estabelecida, a microbiota normal pode beneficiar o hospedeiro ao impedir o crescimento de microrganismos potencialmente

perigosos (KORE et al., 2010). Este fenômeno é conhecido como antagonismo microbiano ou exclusão competitiva (STAINKI, 2012).

O TGI de animais contém trilhões de microrganismos que ajudam a manter a saúde. A microbiota intestinal desempenha um papel crucial na saúde do hospedeiro. Ajuda na digestão e energia provinda da dieta, fornece nutrição para os enterócitos, desempenha um papel no desenvolvimento do sistema imunológico e atua como uma barreira contra a invasão de patógenos (HANDL et al., 2011). Com isso, a manipulação de microrganismos intestinais e seus metabólicos para promover a saúde tem sido de interesse dos pesquisadores por décadas (GARCIA-MAZCORRO et al., 2012). Os metabólitos, resultados da fermentação de carboidratos e aminoácidos no lúmen do intestino incluem os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e são os maiores produtos da fermentação dos microrganismos no intestino, incluindo o ácido acético, propiônico e butírico. O ácido butírico é considerado fonte importante de energia para os colonócitos, suprimindo mais de 70% das necessidades energéticas dessas células (MACFARLANE & MACFARLANE, 2003; WONG et al., 2006), enquanto o ácido acético é benéfico na modulação da permeabilidade intestinal (PANASEVICH et al., 2014).

Durante a fermentação microbiana, compostos nitrogenados endógenos e/ou não-digeridos, várias substâncias putrefativas são formadas, sendo responsáveis pelo mau odor das fezes. Essas substâncias incluem: amônia, aminas alifáticas (agmatina, cadaverina, putrescina e tiramina), ácidos graxos ramificados (isobutirato e isovalerato), indóis (indol, 3-metilindol, 2-metilindol, 2,3-metilindol e 2,5-metilindol), fenóis (fenol, p-cresol e 4-etilfenol) e compostos sulfurados voláteis (dimetil disulfeto, dietil disulfeto, di-n-propil disulfeto e di-n-butil disulfeto). Muitos destes compostos putrefativos exercem efeitos adversos à saúde intestinal (HUSSEIN et al., 1999). A proporção relativa destes compostos é influenciada pela composição da microbiota colônica, interações metabólicas entre bactérias, nutrientes disponíveis para fermentação, tempo de trânsito intestinal, e uma variedade de fatores ligados ao indivíduo, incluindo idade, estado imunológico e composição genética (NRC, 2006).

Projetos internacionais, tais como o Projeto Microbioma Humano e Metagenoma do Trato Gastrointestinal Humano, focados na microbiota humana têm demonstrado a disbiose da microbiota de cavidade oral, nasal, pele, trato urogenital e TGI em frente a diversas doenças, incluindo obesidade, diabetes, doença inflamatória

intestinal e alergias (TURNBAUGH et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2007; LEY, 2010).

Entretanto, para entender o perfil de microbiota intestinal em animais com disbiose, é importante estudar a microbiota de animais saudáveis e compará-la. Jia e colaboradores (2010) utilizaram oito cães saudáveis entre 4 e 13 anos e avaliaram a presença dos microorganismos nas fezes dos animais. O filo mais abundante foi *Firmicutes*, o qual inclui *Clostridium*, *Eubacterium* e *Lactobacillus-Enterococcus*. Outros estudos também confirmam que *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroides* e *Fusobacteria* são filos predominantes de bactérias nas fezes de cães e gatos (HANDL et al., 2011; KIL & SWANSON, 2011; SUCHODOLSKI, 2011; SWANSON et al., 2011; DENG & SWANSON, 2014). A seguir, na figura 10, em um estudo realizado por Garcia-Mazcorro e colaboradores (2012) utilizando a metodologia de pirosequenciamento para a determinação de microbiota, é demonstrada a porcentagem de sequências bacterianas de filos em amostras coletadas de seis cães saudáveis (D1-D6) e em dois pontos de tempo separados (-1 e -2). Neste estudo, é possível observar a prevalência de *Firmicutes*, seguido por *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Acidobacteria*.

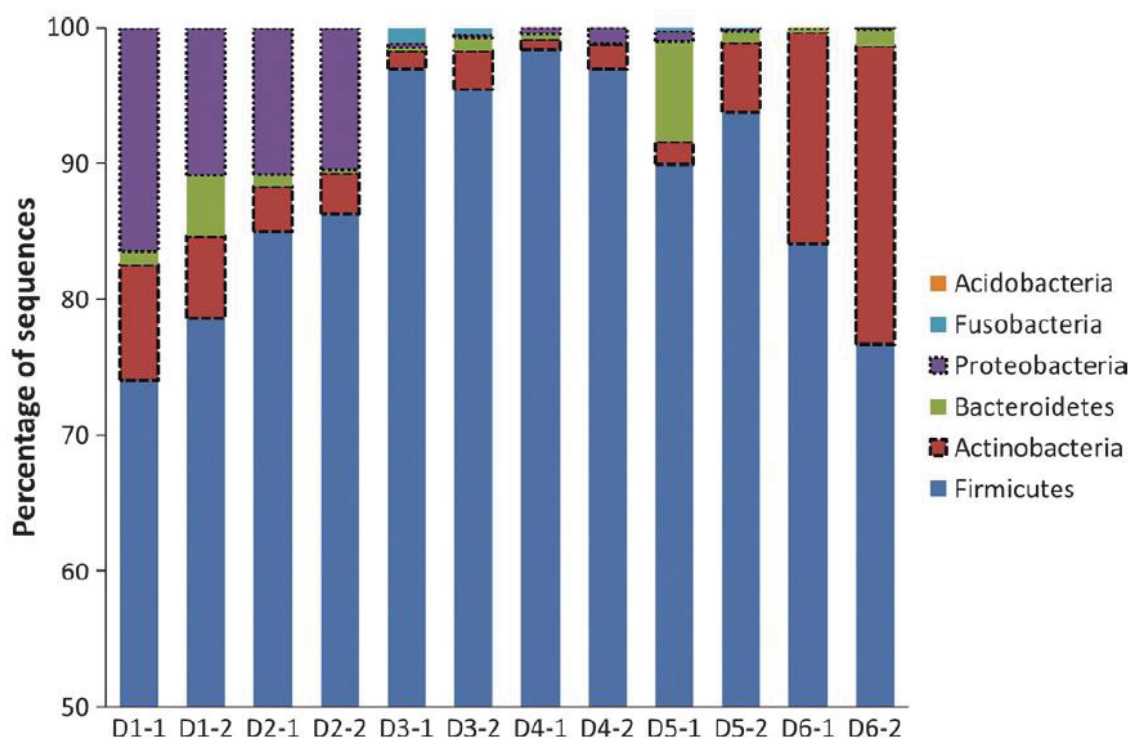


FIGURA 10 – PORCENTAGEM DE SEQUENCIA BACTERIANAS DE FILOS ENCONTRADAS EM AMOSTRAS DE SEIS CÃES (D1-D6), NO TEMPO 1 (DIA 1) E TEMPO 2, APÓS 15 DIAS. FONTE: GARCIA-MAZCORRO ET AL., 2012.

Estudo utilizando métodos de cultivo de bactérias revelaram que *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* spp., e *Enterobacteriaceae* são os grupos de bactérias predominantes no intestino de cães e gatos (MENTULA et al., 2005). Clostrídios são predominantes no duodeno e jejuno e altamente abundante no íleo e cólon, enquanto *Fusobacteria* e *Bacteroides* são bactérias mais abundantes no íleo e cólon. Já os *Lactobacillus* habitam todas as porções do intestino de cães (GRZESKOVIK et al., 2010). A figura 11, a seguir, demonstra a composição da microbiota de cães.

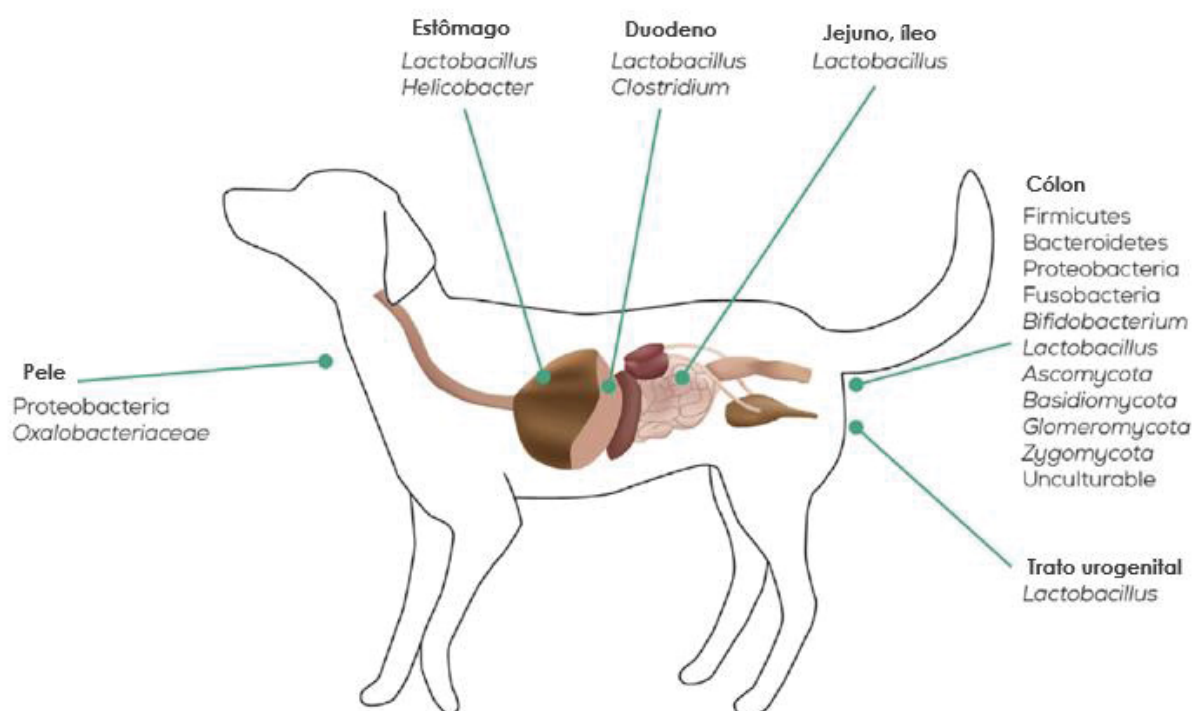


FIGURA 11 – MICRORGANISMOS PREDOMINANTES NO TRATO GASTROINTESTINAL DE CÃES, INCLUINDO PELE E TRATO UROGENITAL. FONTE: ADAPTADO DE GRZESKOVIK ET AL., 2015.

A alteração na microbiota tem sido associada com várias doenças em humanos, incluindo doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável, atopia e obesidade. Em cães, além destas patologias, a mudança na microbiota tem sido associada com diarreia aguda e crônica (JIA et al., 2010; SUCHODOLSKI et al., 2010). Quando há a presença de patógenos específicos, como, por exemplo *Clostridium perfringens* enteropatogênico, *Salmonella* spp., vírus e parasitas, os cães

demonstram sinais clínicos associados à diarreia e doença inflamatória intestinal idiopática. Esta patologia é uma das mais comuns causas de doença gastrointestinal crônica em cães, a qual é caracterizada pela infiltração de células inflamatórias na mucosa do TGI (SUCHODOLSKI et al., 2012).

Em adição, a administração de fármacos, como antibióticos, também é responsável pela mudança na microbiota, sendo a causa mais comum e significativa de perturbar o equilíbrio das espécies ecológicas na microbiota intestinal dos humanos (DETHLEFSEN et al., 2008).

Além de causar disbiose, a administração de antibióticos promove a resistência bacteriana ao longo do TGI. Não somente a resistência às drogas pode ser transferida entre os microrganismos habitantes do TGI, mas também pode ocorrer a disseminação de bactérias que passam regularmente através da barreira mucosa intestinal para a circulação sanguínea, ou seja, microrganismos que inicialmente são inofensivos para o organismo, tornam-se altamente patogênicos (GRONVOLD et al., 2010). Com isso, buscando novas alternativas terapêuticas, diminuição de doses de antibióticos profiláticos e objetivando diminuir a resistência bacteriana, estudos com a utilização da IgY têm se intensificado nos últimos anos (SCHADE et al., 2005).

Geralmente, a ação da IgY administrada por via oral pretende ser alcançada dentro de um local ao longo do TGI, ou seja, é altamente específica e depende da interação antígeno-anticorpo. Vários mecanismos de ação da IgY são propostos na proteção do hospedeiro, os quais incluem: inibição da adesão microbiana às superfícies celulares; supressão da colonização viral, evitando disseminação de células a células; aglutinação bacteriana com imobilização microbiana resultante e morte de bactérias; inibição da atividade enzimática e neutralização da atividade da toxina (RAHMAN et al., 2013).

No organismo, os patógenos como (*Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.) destroem as células do epitélio intestinal e induzem à úlceras, duodenite e enterite. A IgY adicionada à dieta dos animais promove o apoio ao sistema imunológico e estabiliza o poder de resistência para uma vida saudável. Tem benefícios em balancear a microflora intestinal, promover a absorção de nutrientes, reduzir a incidência de estresse induzida por diarreia, aumenta a excreção de IgA fecal (o que indica estimulação imunológica positiva), suporte de proteção da função

intestinal, reduz agentes patogênicos e promove a qualidade fecal (EW NUTRITION, 2013).

Como mecanismo de ação, as IgY se ligam às bactérias, vírus e protozoários (figura 12) e inibem a fixação e replicação de agentes patogênicos na parede intestinal (DEIGNAN et al., 2001).

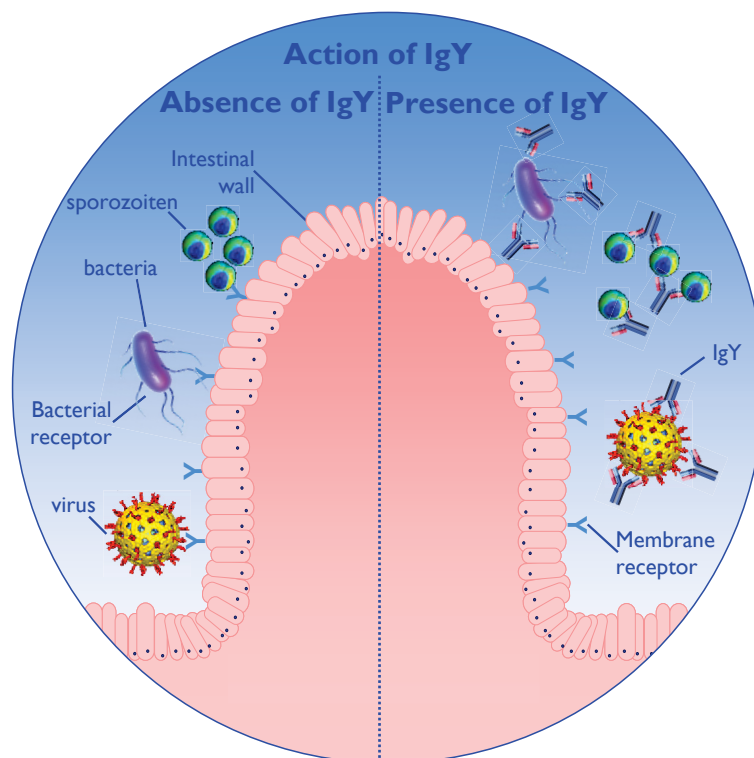


FIGURA 12 – MECANISMO DE AÇÃO DA IgY NO TRATO GASTROINTESTINAL. FONTE: EW Nutrition, 2013.

A utilização de IgY contra agentes virais também tem se mostrada eficiente. Em seu estudo, Nguyen e colaboradores (2006) observaram o efeito da adição de IgY em cães acometidos por parvovírus sobre a recuperação clínica, durante 16 dias. Os cães foram divididos em 3 grupos (3 ou 4 animais), de acordo com a suplementação com a IgY: Grupo 1 (G1) – 2,0g de ovo hiperimunizado; Grupo 2 (G2) – 0,5g de ovo hiperimunizado + 1,5g de ovo em pó; Grupo controle (GC) – 2,0g ovo em pó. Os animais receberam dieta e água *ad libitum* e os tratamentos foram administrados na mesma dose 3 vezes ao dia.

A figura 13, a seguir, demonstra a porcentagem de sinais clínicos observada nos diferentes grupos afetados com o parvovírus canino.

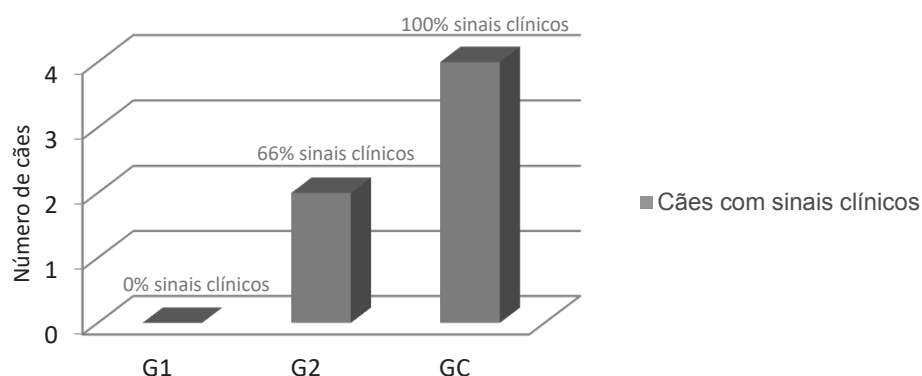


FIGURA 13 – PORCENTAGEM DE SINAIS CLÍNICOS APRESENTADOS NOS DIFERENTES GRUPOS DE CÃES AFETADOS COM PARVOVÍRUS. FONTE: ADAPTADO DE NGUYEN et al., 2006.

No GC, é possível observar que todos os animais (100%) apresentaram sinais clínicos referentes à infecção, os quais são: vômito, diarreia e perda de peso. Já no G2, dos 3 cães, 2 apresentaram vômito e diarreia (representando 66%). Os animais pertencentes ao G1, os quais receberam a suplementação com IgY não apresentaram sinais clínicos. A diminuição da apresentação de sinais clínicos diferenciou nos grupos de acordo com a dose em que foi administrada a suplementação com a imunoglobulina. Este dado indica que o tratamento via oral com IgY específico contra o parvovírus tem efeito de proteção clínica em cães infectados por parvovírus e que este efeito é dependente da dose para os parâmetros de avaliação.

Por se ligar a patógenos específicos, as IgY impedem a replicação viral e bacteriana, promovendo a saúde destes animais. Portanto, a imunoterapia oral, com a utilização de IgY é uma alternativa viável e promissora aos métodos convencionais preventivos e terapêuticos para melhorar a saúde de cães e gatos (RAHMAN et al., 2013).

3.2 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Básica – Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 336p.

ABDALLA, S.L. Análise Computadorizada para avaliação dos índices de Placa Bacteriana e Cálculo Dentário em cães (*canis familiaris*). **Dissertação (Mestrado em**

Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2008. 47p.

ALI, J.; PRAMOD, K.; ANSARI, S.H. Autoimmune responses in periodontal diseases. **Autoimmunity Reviews**. v.10, p.426-431, 2011.

ALLAKER, R.P.; YOUNG, K.A.; LANGLOIS, T.; ROSAYRO, R.; HARDIE, J.M. Dental plaque flora of the dog with reference to fastidious and anaerobic bacteria associated with bites. **Journal of Veterinary Dentistry**. v.14, p.127-130, 1997.

ALZARI, P.M., LASCOMBE, M.B., POLJAK, R.J. Three-Dimensional structure of antibodies. **Annual Review of Immunology**. v.6, p. 555-580, 1988.

AMERICAN VETERINARY DENTAL SOCIETY - AVDS. Disponível em: <http://avds-online.org/>. Acesso em: 11 novembro de 2017.

BOLLEN, L.S.; HAU, J. Immunoglobulin G in the developing oocytes of the domestic hen and immunospecific antibody response in serum and corresponding egg yolk. **In Vivo**. v.11, p.395-398, 1997.

CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJAKER, P.E.; LARSSON, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunologic Research**. v.21, n.1, p.1-6, 2000.

CONWAY, P. L. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. In: Souffrant, W.B., Hagemester, H. **Proceedings of the VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs**. EAAP Publication v.2, n.80, p.231-240. 1994.

COX, E.R.; LEPINE, A.J.; CAREY, D.P. Influencias nutricionales en la salud dental del perro. **Revista de Medicina Veterinária**. v.83, p.265-272, 2003.

DAVIES, E.L.; SMITH, J.S.; BIRKETT, C.R.; MANSER, J.M.; ANDERSON-DEAR, D.V.; YOUNG, J.R. Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes. **Journal of Immunological Methods**. v.186, n.1, p.125-135, 1995.

DEIGNAN, T.; ALWAN, A.; MALONE, L.; KELLY, J.; O'FARRELLY, C. Hen egg yolk prevents bacterial adherence: a novel function for a familiar food. **Journal of Food Science**. v.66, n.1, p.158-161, 2001.

DENG, P.; SWANSON, K.S. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. **British Journal of Nutrition**. v.113, p.S6-S17, 2014.

DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M.L.; RELMAN, D.A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **PLoS Biology**. v.6, n.11, p.2383-2400, 2008.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.135, p.173-180, 2010.

DINIZ, J.A. Produção e caracterização de IgY contra rLipL32 de *Leptospira interrogans*. **Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas**. 2012. 66p.

DIRAVIYAM, T.; ZHAO, B.; WANG, Y.; SCHADE, R.; MICHAEL, A.; ZHANG, X. Effect of chicken egg yolk antibodies (IgY) against diarrhea in domesticated animals: a systematic review and meta-analysis. **Plos One**. v.9, n.5, p.1-14, 2014.

GARCIA-MAZCORRO, J.F.; DOWD, S.E.; POULSEN, J.; STEINER, J.M.; SUCHODOLSKI, J.S. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. **Microbiology Open**. v.1, n.3, p.340-347, 2012.

GASSMANN, M.; THOMMES, P.; WEISER, T.; HUBSCHER, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **FASEB Journal**. v.4, n.8, p.2528-2532, 1990.

GIOSO, M.A. **Odontologia veterinária para o clínico de pequenos animais**. 5.ed. São Paulo: FMVZ- USP, 2003. 202p.

GIOSO, M.A.; CARVALHO, G.G. Oral anatomy of the dog and cat. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. São Paulo, v.35 p. 763-780, 2005.

GORREL, C.; RAWLINGS, J.M. The role of a 'dental hygiene chew' in maintaining periodontal health in dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**. v.13, n.1, p.31-34, 1996.

GRONVOLD, A.R.; L'ABÉE-LUND, T.M.; SORUM, H.; SKANCKE, E.; YANNARELL, A.C.; MACKIE, R.I. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. **FEMS Microbiology Ecology**. v.71, p.313-326, 2010.

HANDL, S.; DOWD, S.; GARCIA-MAZCORRO, J.F.; STEINER, J.M.; SUCHODOLSKI, J.S. Massive parallel16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. **FEMS Microbiology Ecology**. v.76, p.301-310, 2011.

HENNET, P. Nutrición y salud oral en el perro. In: PIBOT, P.; BIOURGE, V.; ELLIOTT, D. **Enciclopedia de la Nutrición Clínica Canina**. Royal Canin. 2006. 516p.

HUSSEIN, H.S., FLICKINGER, E.A., FAHEY JR, G.C. Petfood applications of inulin and oligofructose. **The Journal of Nutrition – American Society for Nutritional Sciences**. p.1454S-1456S, 1999.

IKEMORI, Y.; PERALTA, R. C.; KUROKI, M.; YOKOYAMA, H.; KODAMA, Y. Research note: avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. **Poultry Science**. v.72, n.12, p.2361-2365, 1993.

JIA, J.; FRANTZ, N.; KHOO, C.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A.; McCARTNEY, A.L. Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhea. **FEMS – Microbiology Ecology**. v.71, p.304-312, 2010.

JOHNSON, M. Mouse antibody isotypes/classes, subclasses and mouse antibody isotyping. **Mater Methods**. v.3, n.152, 2013.

KORE, K.B.; PATIL, S.S.; PHONBADA, B.T. Gastrointestinal microbial ecology and its health benefits in dogs. **Veterinary World**. v.3, n.3, p.140-141, 2010.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annual Review Food Science Technology**. v.3, p.163-182, 2012.

KIL, D. L.; SWANSON, K. S. Companion animals symposium: Role of microbes in canine and feline health. **Journal of Animal Science**. v.89, p.1498-1505, 2011.

KUZMUK, K.N.; SWANSON, K.S.; TAPPENDEN, K.A.; SCHOOK, L.B.; FAHEY JR, G.C. Diet and age affect intestinal morphology and large bowel fermentative end-product concentrations in senior and young adult dogs. **Journal of Nutrition**. v.135, p.1940-1945, 2005.

LARSSON, A.; CARLANDER, D.; WILHELMSSON, M. Immune response in chicken with different amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**. v.10, p.29-36, 1998.

LEE, E.N.; SUNVOO, H.H; MENNINEN, K.; SIM, J.S. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**. v.81, p.632-641, 2002.

LEY, R.E. Obesity and the human microbiome. **Current Opinion in Gastroenterology**. v.26, n.1, p.5-11, 2010.

LOGAN, E.I.; WIGGS, R.B.; SCHERL, D. CLELAND, P. Periodontal Disease. In: HAND, M.S.; THATCHER, C.D.; REMILLARD, R.L.; ROUDEBUSH, P.; NOVOTNY, B.J. **Small Animal Clinical Nutrition**. 5th ed. Morris Institute, Mark. p.979-991, 2010.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T. Regulation of short-chain fatty acids. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.62, p.67-72, 2003.

MENTULA, S.; HARMOINEN, J.; HEIKKILA, M.; WESTERMARCK, E.; RAUTIO, M.; HOUVINEN, P.; KONONEN, E. Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in Beagle dogs. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, p. 4169-4175, 2005.

MICHAEL, A.; MEENATCHISUDARAM, S.; PARAMESWARI, G.; SUBBRAJ, T.; SELVAKUMARAN, R.; RAMALINGAM, S. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. **Indian Journal of Science and Technology**. v.3, n.4, p.468-474, 2010.

MINE, Y.; KOVACS-NOLAN, J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. **Journal of Medicinal Food**. v.5, n.3, p.159-169, 2002.

NISHIYAMA, S.A.B.; SENHORINHO, G.N.A.; GIOSO, M.A. AVILA-CAMPOS, M.J. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimes of dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p.23-28, 2007.

NACIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. National academy press. Washington, 2006. 426p.

OTANI, H.; MATSUMOTO, K.; SAEKI, A.; HOSONO, A. Comparative studies on properties of hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**. v.24, p.152-158, 1991.

PAIVA, A.C.; SAAD, F.M.O.B.; LEITE, C.A.L.; DUARTE, A.; PEREIRA, D.A.R.; JARDIM, C.A.C. Eficácia dos coadjuvantes de higiene bucal utilizados na alimentação

de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.59, n.5, p.1177-1183, 2007.

PANASEVICH, M.R.; KERR, K.R.; DILGER, R.N.; FAHEY JR, G.C.; GUÉRIN-DEREMAU, L.; LYNCH, G.L.; WILS, D.; SUCHODOLSKI, J.S.; STEINER, J.M.; DOWD, S.E.; SWANSON, K.S. Modulation of the faecal microbiome of healthy adult dogs by inclusion of potato fibre in the diet. **British Journal of Nutrition**. p.1-9, 2014.

PANDIT, N.; CHANGELA, R.; BALI, D.; TIKOO, P.; GUGNANI, S. *Porphyromonas gingivalis*: Its virulence and vaccine. **Journal of the International Clinical Dental Research Organization**. v.7, n.1, p.51-58, 2015.

PERFECTO, D.R.; NAKATA, H.M.; CADILLO, H.M. *Porphyromonas gingivalis*: Patógeno predominante em la periodontitis crónica. **Odontología Sanmarquina**. v.14, n.1, p.34-38, 2011.

PINNA, C.; BIAGI, G. The utilization of prebiotics and synbiotics in dogs. **Italian Journal of Animal Science**. v.13, p. 169-178, 2014.

POKOROVÁ, D.; FRANZ, J.; STEPÁNEK, J. The use of egg yolk immunoglobulin in the diagnostics of canine parvovirus infections. **Veterinární Medicína**. v.45, n.2, p.49-54, 2000.

RAHMAN, A.K.M.S.; IBRAHIM, E.M.; ISODA, R.; UMEDA, K.; NGUYEN, V.S.; KODAMA, Y. Effect of passive immunization by anti-gingipain IgY on periodontal health of dogs. **Veterinary Science Development**. v.1, n.8, p.35-39, 2011.

RAHMAN, S.; NGUYEN, S.V.; ICATLO JR, F.C.; UMEDA, K.; KODAMA, Y. Oral passive IgY-based immunotherapeutics. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. v.9, n.5, p.1039-1048, 2013.

RIGGIO, M.P.; LENNON, A.; TAYLOR, D.J.; BENNETT, D. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. **Veterinary Microbiology**. v.150, p.394-400, 2011.

RUSSEL, W.M.S.; BURCH, R.L. **The principles of humane experimental technique**. London, UK: Methuen. 1959. 238p.

SCHADE, R.; CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H.R. Chicken egg-yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Atla*, v.33, p.1-26, 2005.

SCHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; HASHIMOTO, K.; SUZUKI, T. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sucker concentrations. **Journal of Food Science**. v.59, p.763-772, 1994.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; SANO, K.; HASHIMOTO, K.; OZEKI, M.; TSUDA, K.; HATTA, H. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.56, p.270–274, 1992.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**. v.25, p.134-44, 1998.

STAINKI, D.R. Microbiota ou Flora Normal. Centro de Ciências da Saúde – CCS. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. **Universidade Federal de Santa Maria**. 2012.

SUCHODOLSKI, J.S. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. v.41, p.261-272, 2011.

SUCHODOLSKI, J.S.; MARKEL, M.E.; GARCIA-MAZCORRO, J.F.; UNTERER, S.; HEILMANN, R.M.; DOWD, S.E.; KACHROO, P.; IVANOV, I.; MINAMOTO, Y.; DILMAN, E.M.; STEINER, J.M.; COOK, A.K.; TORESSON, L. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. **PLoS One**. v.7, n.12, p.1-13, 2012.

SUGITA-KONISHI, Y., SHIBATA, K., YUN, S.S., HARA-KUDO, Y., YAMAGUCHI, K., KUMAGAI, S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 60, n. 5, p. 886-888, 1996.

SUNWOO, H.H.; LEE, E.N.; MENNINEN, K.; SURESH, M.R.; SIM, J.S. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* 0157:H7. **Journal of Food Science**. v.67, p.1486-1494, 2002.

SWANSON, K.S.; DOWD, S.E.; SUCHODOLSKI, J.S.; MIDDELBOSS, I.S.; VESTER, B.M.; BARRY, K.A.; NELSON, K.E.; TORRALBA, M.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; CANN, I.K.O.; WHITE, B.A.; FAHEY JR, G.C. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. **The ISME Journal – International Society for Microbial Ecology**. v.5, p.639-649, 2011.

TEIXEIRA, S.; MATTARAZO, F.; FERES, M.; FIGUEIREDO, L.; DE FAVERI, M.; SIMIONATO, M.; MAYER, M.P. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* genotypes in smoker chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**. v.36, n.6, p.482-487, 2009.

TELHADO, J.; MAGANIN JUNIOR, A.; DIELE, C.A.; MARINHO, M.S. Incidência de cálculo dentário e doença periodontal em cães da raça pastor alemão. **Ciência Animal Brasileira**. v.5, n.2, p.99-104, 2004.

TESAR, D.B.; CHEUNG, E.J.; BJORKMAN, P.J. The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. **Molecular Biology of the Cell**. v.19, n.4, p.1587-1593, 2008.

TINI, M.; JEWELL, U.R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.131, p.569-574, 2002.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.; GORDON, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**. v.444, p.1027-1031, 2006.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. **Nature**. v.449, p.8004-810, 2007.

WHYTE, A.; BONASTRE, C.; MONTEAGUDO, L.V.; LES, F.; OBON, J. Canine stage 1 periodontal disease: A latent pathology. **The Veterinary Journal**. v.201, p.118-120, 2014.

WONG, J.M.W.; DE SOUZA, R.; KENDALL, C.W.C.; EMAM, A.; JENKINS, D.J.A. Colonic Health: Fermentation and short chain fatty acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**. v.40, n.3, p.235-243, 2006.

XU, Y.; LI, X.; JIN, L.; ZHEN, Y.; LU, Y.; LI, S.; YOU, J.; WANG, L. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. **Biotechnology advances**. v.29, p.860–868, 2011.

ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**. v.8, n.8, p.364-371, 2003.

4 INCLUSÃO DE IgY ANTI-*Porphyromonas gingivalis* NA SAÚDE ORAL DE CÃES ANTES E APÓS A PROFILAXIA DENTÁRIA.

INCLUSION OF IgY ANTI-*Porphyromonas gingivalis* IN ORAL HEALTH BEFORE AND AFTER DENTAL PROPHYLAXIS IN DOGS.

4.1 RESUMO

A doença periodontal é a patologia diagnosticada com maior frequência na rotina da clínica veterinária em cães e gatos. É resultante do acúmulo de placa bacteriana na superfície do dente, a qual sofre mineralização, formando o cálculo dentário. Para melhorar o sucesso do tratamento, os estudos com a inclusão de imunoglobulina Y com a finalidade de diminuir a doença periodontal por meio da inibição de *Porphyromonas gingivalis* são fundamentais para diminuir a casuística dessa doença na prática clínica. Com base nisso, foram empregados 14 cães da raça Beagle para avaliar o efeito curativo da IgY anteriormente à profilaxia dentária e o efeito preventivo da IgY após a profilaxia dentária. Os animais foram divididos em 2 grupos – controle (0%IgY) e teste (0,4%IgY) e as avaliações de teor de *Porphyromonas gingivalis*, área de placa, e parâmetros clínicos (índice gengival, halitose, hipersalivação, espessura de cálculo, espessura de placa e profundidade de bolsa) foram realizadas. No experimento 1 – curativo, foi possível observar diminuição do teor de *Porphyromonas gingivalis* após 4 semanas no grupo em que recebeu a adição de IgY na dieta ($P<0,05$). A área de placa também diminuiu em cães do grupo IgY após 8 semanas ($P<0,05$). A inclusão de IgY diminuiu os níveis de índice gengival, halitose e espessura de cálculo na avaliação clínica após 8 semanas ($P<0,05$ e $P<0,10$). Já no experimento 2 – preventivo, a inclusão de IgY foi efetiva após 2 e 8 semanas em retardar o crescimento de placa bacteriana, mantendo os níveis de área de placa menores em comparação com o grupo controle ($P<0,05$). Os demais parâmetros avaliados não diferiram entre os grupos. Com os resultados expostos, é possível concluir que a utilização de IgY em cães para melhorar a saúde oral, diminuir os níveis de *Porphyromonas gingivalis* e área de placa, assim como retardar o aparecimento de placa bacteriana após profilaxia dentária é efetiva.

Palavras-chave: Animais de companhia; Cálculo dentário; Doença periodontal; Imunoglobulina Y; *Porphyromonas gingivalis*.

4.2 ABSTRACT

Periodontal disease is a pathology with higher frequency diagnostic in the small animal practice. It results from the accumulation of bacterial plaque on the surface of the tooth and, subsequently, forming the dental calculus. To improve the success of treatment, studies with immunoglobulin Y to reducing a periodontal disease by inhibiting *Porphyromonas gingivalis*, a major periodontal pathogen, are fundamental to reduce casuistry of this disease in clinical practice. Based on this, 14 four-year-old Beagle dogs were involved in this study to evaluate the curative effect of IgY before dental prophylaxis and the preventive effect of IgY after dental prophylaxis. The animals were divided into two groups: control (0% IgY) and test (0.4% IgY) and evaluations of *Porphyromonas gingivalis* content, plaque area and clinical parameters (gingival index, halitosis, hypersalivation, dental calculus and plaque thickness and pocket depth) were performed. In the experiment 1 – curative, it was possible to observe a decrease in the content of *Porphyromonas gingivalis* after 4 weeks in the group which received the addition of IgY in the diet ($P < 0.05$). After 8 weeks, the plaque area also decreased in dogs of the IgY group ($P < 0.05$). The inclusion of IgY decreased gingival index, halitosis and dental calculus thickness in the clinical evaluation after 8 weeks ($P < 0.05$ and $P < 0.10$). In experiment 2 – preventive, the inclusion of IgY was effective after 2 and 8 weeks in delaying the growth of bacterial plaque, maintaining lower plaque area levels compared to the control group ($P < 0.05$). The other parameters evaluated did not differ between groups. With the results shown, it is possible to conclude that the use of IgY in dogs to improve oral health, decrease levels of *Porphyromonas gingivalis* and plaque area, as well as delay the appearance of plaque after dental prophylaxis is effective.

Keywords: Companion animals; dental calculus; immunoglobulin Y; periodontal disease; *Porphyromonas gingivalis*.

4.3 INTRODUÇÃO

A doença periodontal, patologia de maior ocorrência na clínica de animais de companhia, é observada em cães acima de três anos de idade, com uma frequência de aproximadamente 85% (COSTA SILVA et al., 2017; RIGGIO et al., 2011). Se não tratada, é progressiva com o avançar da idade, promovendo alterações sistêmicas graves, tais como diabetes mellitus, insuficiência renal, hepática e cardiopatias (DE

SIMOI, 2012; HENNET, 2006). Diversos estudos demonstram que animais alimentados com dietas úmidas são mais predispostos a apresentar a doença (GORREL et al., 1996; LOGAN et al., 2002). Em contrapartida, o fornecimento de alimentos secos extrusados e que exigem uma maior preensão e mastigação vigorosas são preferíveis para cães e gatos (GAWOR et al., 2006).

Esta patologia envolve o periodonto, o qual é um conjunto de tecidos que desempenham a função de sustentação e proteção de um dente na cavidade oral, sendo composto pela gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (BAIA et al., 2017; GORREL, 2010). Com o aumento da placa bacteriana e a mineralização, formando o cálculo dentário, há uma mudança na microbiota, a qual é associada à periodontite e consiste, principalmente em *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., e *Fusobacterium* spp. (BRAGA et al., 2005; CARVALHO & CABRAL, 2007; NISHIYAMA et al., 2007). A *Porphyromonas gingivalis* é considerada o patógeno de maior importância na doença periodontal (PERFECTO et al., 2011; INAMURA, 2013; SHIMIZU et al., 2017), pois é a bactéria detectada com maior frequência em lesões de periodontite em humanos, ratos e primatas, sendo associada com o início e progressão da doença (RAHMAN et al., 2011).

Com isso, a imunoterapia com a utilização de anticorpos específicos provindos da gema do ovo de galinhas (IgY) contra a doença periodontal vem sendo estudada devido ao seu alto grau de especificidade para obter a diminuição de *Porphyromonas gingivalis* na cavidade oral (SOCRANSKY et al., 1998; YOKOYAMA et al., 2007a; YOKOYAMA et al., 2007b). O uso de IgY como tratamento profilático e terapêutico tem sido uma alternativa cada vez mais viável e eficiente, pois possui vantagens sobre a utilização de anticorpos provindos de mamíferos (SCHADE et al., 2005), tais como bem-estar animal, vantagens econômicas, boa resistência à baixo pH e boa estabilidade (SHIMIZU et al., 1992). Portanto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da inclusão de IgY na dieta seca extrusada contra a doença periodontal em cães.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Animais e instalações

Foram utilizados 14 cães adultos (8 machos e 6 fêmeas) da raça Beagle, com quatro anos de idade, pesando $8,9 \pm 1,1$ kg. Os animais, os quais nunca realizaram

tratamento odontológico, possuem vacinação e vermifugação em dia, foram previamente submetidos à exames clínicos que atestaram seu estado de higidez. Após, foram alojados aleatoriamente em baia de alvenaria com solário de 2 x 5 m.

Os animais foram distribuídos ao acaso e dois experimentos foram conduzidos. No experimento 1, o qual avaliou a ação curativa da IgY-anti *Porphyromonas gingivalis*, os cães foram avaliados durante 8 semanas. Antes do início do experimento 2, realizado com a finalidade de avaliar a ação preventiva da IgY-anti *Porphyromonas gingivalis*, foi feita limpeza periodontal completa nos cães (MICHELL, 2005). Os animais foram previamente sedados recebendo como medicação pré-anestésica acepromazina (0,1 mg/kg via intravenosa). A indução anestésica foi feita com propofol (6 mg/kg via intravenosa) e a manutenção com halotano (12,5 mg/kg via inalatória). Foi monitorada a frequência cardíaca e respiratória dos animais durante o procedimento. Os cães receberam cetoprofeno (1 mg/kg via oral) como antiinflamatório e analgésico a cada 24 h durante 3 dias após o procedimento. No experimento 2, os cães também foram avaliados por 8 semanas.

4.4.2 Dietas

Foram formuladas duas dietas isonutritivas e isocalóricas segundo as necessidades nutricionais de cães adultos recomendadas pela AAFCO (2004), sendo uma controle (0% IgY) e outra teste (0,4% IgY). As dietas foram extrusadas e a IgY foi aplicada em cobertura após a extrusão da dieta teste.

4.4.3 Avaliações clínicas

Sete cães receberam a dieta controle e sete cães receberam a dieta teste, duas vezes ao dia, às 08 horas e às 16 horas, segundo as necessidades de energia metabolizável (NEM) de cães adultos recomendada pelo NRC (2006), sendo: $NEM (kcal/dia) = 130 \times peso\ corporal^{0,75}$.

Foram avaliados a contagem total bacteriana; teor de *Porphyromonas gingivalis* por PCR; índice gengival (LÖE & SILNESS, 1963); índices de placa bacteriana e de cálculo (LOGAN & BOYCE, 1994); índice de halitose; hipersalivação e profundidade de bolsa (Ew Nutrition, 2011), conforme descrito nas tabelas 2 e 3.

TABELA 2 – PONTUAÇÃO PARA MENSURAÇÃO DO ÍNDICE DE PLACA BACTERIANA E ÍNDICE DE CÁLCULO.

Item	Característica
Pontuação de espessura para placa	
1	Rosa (espessura fina)
2	Vermelho (espessura média)
3	Vermelho escuro (espessura grossa)
Pontuação de espessura para cálculo	
1	Amarelo claro
2	Marrom claro
3	Marrom escuro

Fonte: Adaptado de Logan & Boyce, 1994.

TABELA 3 – PONTUAÇÃO PARA O ÍNDICE GENGIVAL, HALITOSE, HIPERSALIVAÇÃO E PROFUNDIDADE DE BOLSA.

Item	Característica
Índice gengival ¹	
0	Ausência de inflamação
1	Inflamação leve (pequena mudança na cor e textura, ausência de sangramento à sondagem)
2	Inflamação moderada (vermelhidão, edema e hipertrofia; sangramento à sondagem)
3	Inflamação severa (vermelhidão acentuada e hipertrofia; sangramento espontâneo; ulceração)
Halitose ²	
0	Sem odor
1	Suave mau odor
2	Moderado mau odor
3	Forte mau odor
Hipersalivação ²	
0	Ausência
1	Baixa
2	Média
3	Alta
Profundidade de bolsa ²	
0	Profundidade do sulco gengival menor que 2,0 mm
1	Profundidade do sulco gengival maior que 2,0 mm
2	Bolsa periodontal alcança o osso alveolar na raiz do dente
3	Dente com mobilidade, perda dentária

Fonte: Adaptado de ¹Löe & Silness, 1963; ²EW Nutrition, 2011.

A avaliação de índice de cálculo dentário foi realizada antes da avaliação da placa bacteriana. Em seguida, previamente à avaliação de placa bacteriana, a superfície dos dentes foi corada com Eviplac®, solução evidenciadora de placa bacteriana à base de fucsina básica 0,7%, suavemente aplicado com o auxílio de algodão sobre a superfície da coroa dos dentes, sendo imediatamente em seguida lavada com água. As avaliações foram feitas nos seguintes dentes da maxila e mandíbula em ambos lados: 3º incisivo, canino, 3º e 4º pré-molares e 1º molar. Os escores obtidos para cobertura de placa e cálculo foram multiplicados com os respectivos dados obtidos para espessura de placa e cálculo para cada dente. Os resultados foram então somados e divididos pelo número de dentes avaliados, para obter-se o índice de área de placa bacteriana e o índice de área de cálculo, respectivamente, da cavidade oral de cada animal.

As avaliações, nos dois experimentos, foram feitas nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 semanas, com exceção da contagem total bacteriana e teor de *Porphyromonas gingivalis*, que foram feitas nos tempos 0, 4 e 8 semanas.

4.4.4 Avaliação computadorizada

Fotografias digitais da cavidade oral de cada animal foram tiradas nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 semanas, para obtenção do percentual de área acometida por placa bacteriana e cálculo e do índice de área de placa bacteriana e índice de área de cálculo. Uma régua graduada em milímetros foi posicionada acima da boca do cão como referência para a mensuração.

As fotos foram realizadas antes e após coloração com fucsina básica 0,7% com resolução de 12 Megapixel. A distância da câmera em relação aos dentes foi proporcional ao campo visual desejado, o eixo da lente objetiva da máquina fotográfica foi direcionado perpendicular à superfície vestibular dos dentes (adaptado de Abdala, 2008). As imagens digitalizadas foram tratadas pelo programa ImageJ® (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, United States of America) para mensuração da área total dos dentes avaliados, área de cálculo e área de placa dentária.

4.4.5 Teor de *Porphyromonas gingivalis* quantificada por PCR em tempo real

4.4.5.1 Coleta das amostras e extração do DNA bacteriano total.

Os biofilmes da região gengival do dente 4º pré-molar, lado esquerdo, foram coletados por cureta Gracey 5/6 e depositados individualmente em microtubos contendo 330µL de solução Tris-HCl (0.01M). As amostras foram congeladas à -20°C e transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, para a extração do DNA bacteriano total e análises quantitativas por qPCR.

A extração do DNA foi realizada através de lise mecânica com 0,16g de esferas de zircônia (0.1mm de diâmetro – Biospec, EUA) em aparelho de *Mini-BeadBeater* (Biospec) em força máxima, durante 60 segundos. Após, as amostras receberam 500µL de solução EL Buffer (Qiagen, Alemanha), foram brevemente vortexadas e, finalmente, centrifugadas (10 min, 4°C, 13.000g). O sobrenadante contendo o DNA total solubilizado, livre de esferas e debris celulares, foi coletado e transferido a um novo microtubo.

4.4.5.2 Quantificação do DNA bacteriano total e de *Porphyromonas gingivalis*

As reações de PCR foram realizadas em aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) que possibilitou a quantificação direta e em tempo real do DNA bacteriano total, através de *primers* universais (Nadkarni et al., 2002) e do DNA pertencente à espécie *Porphyromonas gingivalis*, através de *primers* específicos (Ashimoto et al., 1996).

Os ensaios foram realizados em placas de 48 poços *MicroAmp® Fast-Optical 48-well Reaction Plate* (Applied Biosystems), colocando-se, em cada poço da placa, uma mistura de: 3,4µl de H₂O ultrapura, 5µl do reagente *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,3µl de cada *primer* à 10µM (tabela 2) e 1µl da amostra a ser dosada. As amostras, padrões e controles foram avaliados em duplicata (dois poços da placa de qPCR).

Como referência da quantidade e controle positivo, além de indicador de eficiência e sensibilidade das reações, em cada corrida realizou-se curvas de amplificação, as quais continham quantidades conhecidas de DNA genômico bacteriano em quantidades decrescentes: 30ng, 3ng, 0,3ng, 0,03ng, 0,003ng e 0,0003ng por poço (*Porphyromonas gingivalis* ATCC BAA-308). Como controle negativo do PCR e indicador de possível contaminação por DNA, os ensaios incluíram poços contendo todos os reagentes, mas sem adição de amostras.

As placas seladas foram então submetidas aos ciclos térmicos de desnaturação inicial a 95°C por 3min, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 15s, anelamento a 54°C por 15s e extensão a 72°C por 30s. Curvas de *melting* foram realizadas nas placas contento ensaios com o par de *primer* específico para *Porphyromonas gingivalis*.

Os valores de qPCR para a dosagem do DNA de *Porphyromonas gingivalis* foram normalizados pelas quantidades de DNA bacteriano total de cada uma das amostras e, assim, a quantidade de *Porphyromonas gingivalis* foi expressa em porcentagem em relação à carga bacteriana total presente no biofilme.

TABELA 4 – PRIMERS PARA A IDENTIFICAÇÃO E A QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE BACTERIANA TOTAL E DE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL.

Alvo	Primers	Número de bases
Bactérias totais	5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'	466
	5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5'-AGGCAGCTTGCCATACTGCG-3'	404
	5'-ACTGTTAGCAACTACCGATGT-3'	

4.4.6 Análise estatística

O experimento foi analisado segundo delineamento inteiramente casualizado, no qual sete cães receberam a dieta controle e sete a dieta teste, totalizando em sete repetições por tratamento. Os dados foram previamente analisados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e quanto à homocedasticidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, à 5% de probabilidade.

4.5 RESULTADOS

4.5.1. Avaliações clínicas

Todos os cães utilizados no experimento permaneceram saudáveis durante o período de teste. Os resultados das avaliações clínicas no experimento 1 e experimento 2 estão demonstrados nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Na etapa do experimento 1 – curativo, é possível observar redução no índice gengival e halitose de cães presentes no grupo teste, após 8 semanas do

fornecimento da IgY, quando comparado à semana 0 ($P<0,05$). Houve tendência na redução da espessura de cálculo e espessura de placa avaliada após 8 semanas, em comparação à semana 0 ($P<0,10$). No experimento 2 – preventivo, após a profilaxia dentária, não houve alterações nos parâmetros clínicos avaliados em 8 semanas.

TABELA 5 – MÉDIAS DOS PARÂMETROS CLÍNICOS AVALIADOS NAS SEMANAS 0, 2, 4, 6 E 8 ANTERIORMENTE À PROFILAXIA DENTÁRIA, NOS ANIMAIS PERTENCENTES AO GRUPO CONTROLE E GRUPO IgY (EXPERIMENTO 1).

[illegible]

*P<0,05; **P<0,10 pelo teste de Kruskal-Wallis, comparada com a semana 0.

TABELA 6 – MÉDIAS DOS PARÂMETROS CLÍNICOS AVALIADOS NAS SEMANAS 0, 2, 4, 6 E 8 POSTERIORMENTE À PROFILAXIA DENTÁRIA, NOS ANIMAIS PERTENCENTES AO GRUPO CONTROLE E GRUPO IgY (EXPERIMENTO 2).

[illegible]

A figura 14 demonstra as fotografias representativas da cavidade oral de dois cães (A, B) participantes do grupo teste (IgY) durante a etapa 1 – curativa. Em 8 semanas estes cães apresentaram redução clara do acúmulo de cálculo dentário e placa bacteriana nos dentes.

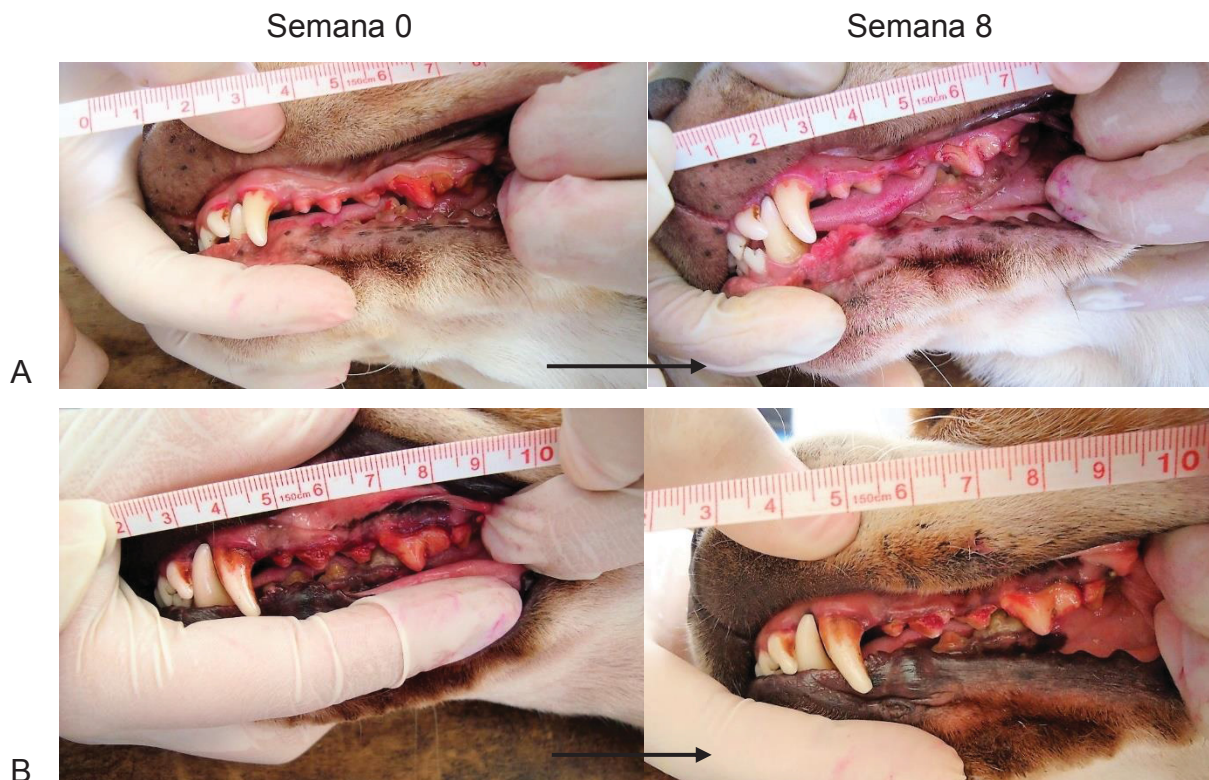


FIGURA 14 – FOTOGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA CAVIDADE ORAL DE 2 CÃES (A, B) PARTICIPANTES DO EXPERIMENTO 1 MOSTRANDO O EFEITO CURATIVO DA IgY NA REMOÇÃO DO CÁLCULO DENTAL. OS MESMOS DENTES FORAM FOTOGRAFADOS NO DIA 0 E APÓS 8 SEMANAS DA INCLUSÃO DA DIETA COM IgY.

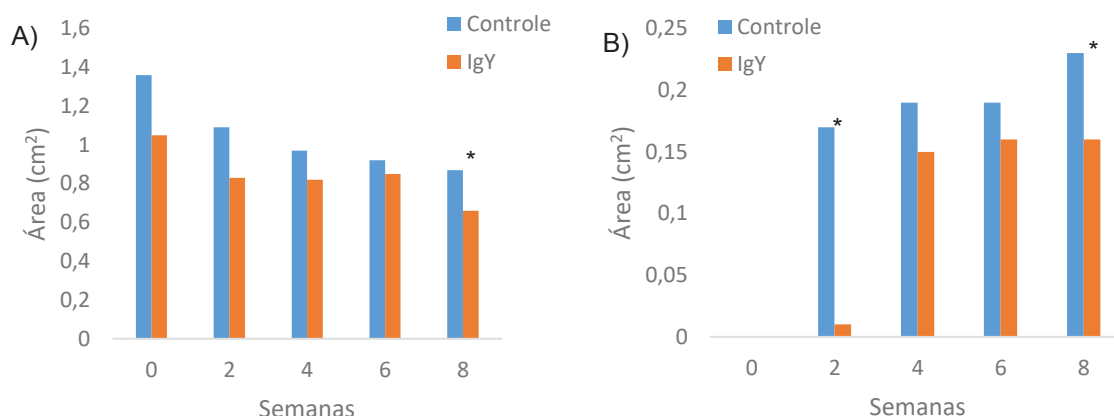
Já no experimento 2 – preventivo (figura 15), após 8 semanas de avaliação, é possível observar discreto acúmulo de cálculo dentário e placa bacteriana na cavidade oral de dois cães (C, D) pertencentes ao grupo teste (IgY).



FIGURA 15 – FOTOGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA CAVIDADE ORAL DE 2 CÃES (C, D) PARTICIPANTES DO EXPERIMENTO 2 MOSTRANDO O EFEITO PREVENTIVO DA IgY NA FORMAÇÃO DO CÁLCULO DENTAL. OS MESMOS DENTES FORAM FOTOGRAFADOS NO DIA 0 E APÓS 8 SEMANAS DA INCLUSÃO DA DIETA COM IgY.

4.5.2 Avaliação computadorizada

Após 8 semanas do recebimento da dieta, foi possível observar, no experimento 1 – curativo, diminuição significativa da área de placa observada na superfície dentária dos cães participantes do grupo teste em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$). Quando comparados os grupos após a profilaxia dentária (experimento 2 – preventivo), em 2 e 8 semanas, os animais do grupo IgY possuíram menor área de placa bacteriana em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$). Os dados estão representados na figura 16.

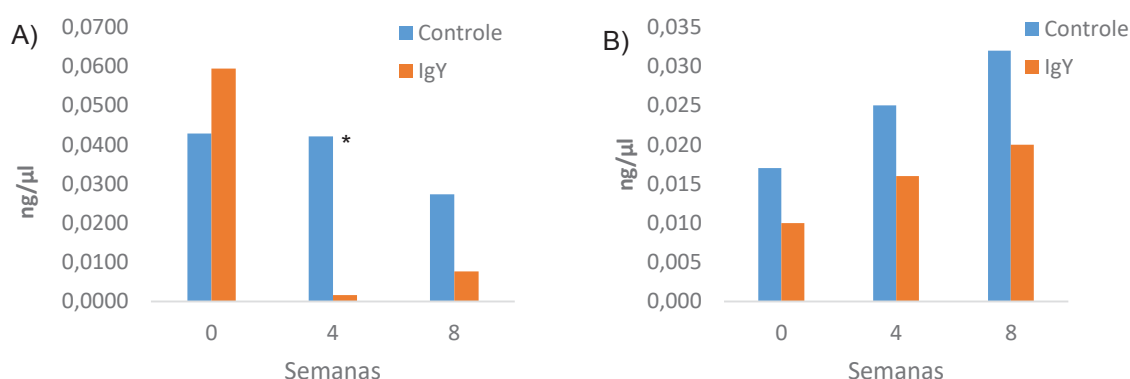


*P<0,05 pelo teste de Kruskal-Wallis.

FIGURA 16 – MÉDIAS DE ÁREA DE PLACA EM CÃES SUPLEMENTADOS COM E SEM IgY, EFEITO CURATIVO – EXPERIMENTO 1 (A) E EFEITO PREVENTIVO – EXPERIMENTO 2 (B) AVALIADA EM 0, 2, 4, 6 E 8 SEMANAS.

4.5.3 Teor de *Porphyromonas gingivalis*

Após 4 semanas do recebimento das dietas, no experimento 1 – curativo, houve redução significativa no teor de *Porphyromonas gingivalis* ($P<0,05$) presente na cavidade oral dos cães no grupo IgY em comparação ao grupo controle. No período de avaliação de 8 semanas após a profilaxia dentárias, não houve diferenças significativas no teor de *Porphyromonas gingivalis* na cavidade oral de cães (figura 17).



*P<0,05 pelo teste de Kruskal-Wallis.

FIGURA 17 – TEOR DE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* EM CÃES SUPLEMENTADOS COM IgY, EFEITO CURATIVO – EXPERIMENTO 1 (A) E EFEITO PREVENTIVO – EXPERIMENTO 2 (B) AVALIADO EM 0, 4 E 8 SEMANAS.

4.6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou a eficácia da suplementação de IgY contra *Porphyromonas gingivalis* no alimento seco extrusado de cães antes e após o procedimento de profilaxia dentária sobre os parâmetros clínicos com o objetivo de observar a eficácia no tratamento e prevenção da doença periodontal.

Porphyromonas gingivalis é a principal bactéria causadora da periodontite. Essa bactéria, anaeróbia, produz e libera uma grande quantidade de enzimas proteolíticas, entre elas, a gingipaína, responsável por destruir o periodonto (INAMURA, 2013). Em 2011, Rahman et al. realizaram um estudo *in vitro* para demonstrar a ação da IgY contra o crescimento de *Porphyromonas gingivalis*. Os autores demonstraram que a IgY foi capaz de proteger as células contra danos pelas enzimas proteolíticas expressadas pela *Porphyromonas gingivalis*. Em nosso estudo, o uso de IgY foi *in vivo*, ou seja, a inclusão de IgY foi realizada por cobertura após a extrusão da dieta e foi oferecida aos animais durante 8 semanas. Na etapa 1 – avaliação do efeito curativo, anteriormente à realização da profilaxia dentária, os animais do grupo teste apresentaram diminuição no teor de *Porphyromonas gingivalis* na cavidade oral, avaliada por PCR em tempo real, após 4 semanas da inclusão da IgY na dieta, em comparação ao grupo controle. Esses dados corroboram com os resultados encontrados anteriormente por outros autores, os quais obtiveram *in vivo*, a diminuição dos níveis de *Porphyromonas gingivalis* encontrados em humanos, os quais foram suplementados com a IgY durante 4 semanas (YOKOYAMA et al., 2007).

Além de diminuir os níveis da principal bactéria causadora da doença periodontal, a inclusão de IgY também foi benéfica para melhorar os índices inflamatórios que esta patologia causa na cavidade oral. As avaliações clínicas demonstraram diminuição do índice gengival e diminuição de halitose presente nos animais do grupo teste após 8 semanas da inclusão de IgY. Esses resultados indicam que a IgY é útil em reduzir a inflamação na cavidade oral, assim como prevenir a doença periodontal em cães (RAHMAN et al., 2011). A halitose é um dos principais sinais clínicos associados com a doença periodontal (LOGAN et al., 2002) e está intimamente ligada com a presença de *Porphyromonas gingivalis* na cavidade oral de cães (ALLAKER, 2010). Outros parâmetros clínicos avaliados não sofreram alterações, como a profundidade de bolsa periodontal. Esse resultado corrobora com Rahman et al. (2011), em que a profundidade de bolsa avaliada nos cães com a

suplementação de IgY não sofreu alteração em um período de 8 semanas. Uma possível explicação, como demonstrada pelos autores, é de que a IgY, fornecida por via oral juntamente à dieta não adentra na bolsa periodontal, permanecendo somente no periodonto.

Já a diminuição da espessura de cálculo dentário e placa bacteriana, assim como a diminuição da área de placa, resultados encontrados em nosso estudo, também demonstra a importante função da IgY contra esta patologia. Este efeito de remoção de cálculo dentário é relatado com a inclusão de produtos de uso exclusivo veterinário para manter a saúde oral, assim como dietas formuladas para a diminuição do cálculo e placa são baseadas em duas estratégias: remoção mecânica e remoção química. A remoção mecânica da placa pode ser realizada com a utilização de *snacks* e alimento seco extrusado com formatos diferenciados para a promover a mastigação e consequentemente, obter maior superfície de contato com o dente. Já os agentes químicos agem por meio de quelantes de cálcio, impedindo a formação do cálculo (LARSEN, 2010). Com isso, a inclusão de IgY para diminuir a espessura de cálculo e placa bacteriana pode enfraquecer o biofilme formado na superfície do dente, resultando na mudança da estrutura do cálculo dentário (RAHMAN et al., 2011).

Após o procedimento de profilaxia dentária, a suplementação com a IgY teve continuidade e os cães foram avaliados por mais 8 semanas, com o objetivo de avaliar o efeito preventivo da IgY na doença periodontal. Neste período de avaliação, não houve mudanças nos parâmetros clínicos avaliados. Mesmo obtendo valores menores no teor de *Porphyromonas gingivalis* nas amostras dos cães presentes no grupo IgY, diferenças significativas entre os dois grupos não foram encontradas. Em contrapartida, a área de placa bacteriana e cálculo dentário permaneceu menor nos animais do grupo teste em comparação ao grupo controle. O efeito de retardar o aparecimento de placa bacteriana é desejável, pois o biofilme supragengival inicialmente é composto por bactérias gram-positivas aeróbicas. Com o passar do tempo, a flora bacteriana sofre mudanças, tornando-se predominantes gram-negativas e anaeróbicas, sendo prejudicial ao animal (LOGAN et al., 2002). Essas características na flora bacteriana contribuem para o desenvolvimento da doença e estão presentes principalmente na *Porphyromonas gingivalis*, microrganismo envolvido na patologia da doença periodontal (NISHIYAMA et al., 2007).

4.7 CONCLUSÃO

Com os resultados expostos no presente estudo, a utilização de IgY em dietas secas extrusadas para cães tem demonstrado ser um efetivo agente na proteção da doença periodontal.

4.8 REFERÊNCIAS

ABDALA, S.L. Análise computadorizada para avaliação dos índices de placa bacteriana e cálculo dentário em cães (*Canis familiaris*). **Dissertação (mestrado em medicina veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. 2008, 48p.

ALLAKER, R.P. Investigations into the micro-ecology of oral malodour in man and companion animals. **Journal of Breath Research**. v.4, p. 1-6, 2010.

AMERICAN VETERINARY DENTAL SOCIETY - AVDS. Disponível em: <http://avds-online.org/>. Acesso em: 11 novembro de 2017.

ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiology Immunology**. v.11, n.4, p.266-273, 1996.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS - AAFCO. **Official Publications 2004**. Association of American Feed Control Officials, 2004.

BAIA, J.D.; LEMOS, R.S.; MOREIRA, A.B.; GIOSO, M.A. Doença periodontal em cães: revisão de literatura. **Scientific Eletronic Archives**. v.10, n.5, p.150-162, 2017.

BRAGA, C.A.S.B.; RESENDE, C.M.F.; PESTANA, A.C.N.R.; CARMO, L.S.; COSTA, J.E.; SILVA, L.A.F.; ASSIS, L.N.L.; LIMA, L.A.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R.

Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça Pastor Alemão. **Ciência Rural**. v.35, n.2, p.385-390, 2005.

CARVALHO, C.; CABRAL, C. Papel da *Porphyromonas gingivalis* na doença periodontal. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**. v.48, n.1, p.167-171, 2007.

COSTA SILVA, R.C.; CAMPOS, D.R.; OLIVEIRA, P.; LAGUNA, A.G.V.; MAGALHÃES, V.S.; CID, Y.P.; ALMEIDA, M.B.; SCOTT, F.B.; FERNANDES, J.I. Eficácia de um gel de quitosano mucoadesivo contendo doxiciclina associada ou não ao meloxicam como coadjuvante ao tratamento da gengivite em cães portadores da doença periodontal. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.38, n.2, p.40-44, 2016.

DE SIMOI, A. Systemic implications of periodontal disease. **Veterinary Focus**. v.22, n.3, p.25-30, 2012.

GAWOR, J.P.; REITER, A.M.; JODKOWSKA, K.; KURSKI, G.; WOJTACKI, M.P.; KUREK, A. Influence of diet on oral health in cats and dogs. **Journal of Nutrition**. v.135, n.7, p.2021S-2023S, 2006.

GORREL C.; RAWLINGS, J.M. The role of tooth-brushing and diet in the maintenance of periodontal health in dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**. v.13, p.139-143, 1996.

GORREL, C. **Odontologia em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 240p.

HENNET, P.; SERVET, E.; VENET, C. Effectiveness of an oral hygiene chew to reduce dental deposits in small breed dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, v.23, n.1, p.6-12. 2006a.

HENNET, P. Nutrición y salud oral en el perro. In: PIBOT, P.; BIOURGE, V.; ELLIOTT, D. **Enciclopedia de la Nutrición Clínica Canina**. Royal Canin. 2006b. 516p.

INAMURA, T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. **Journal of Periodontology**. v.74, n.1, p.111-118, 2013.

LARSEN, J. Oral products and dental diseases. **Focus on Nutrition. Compendium: Continuing Education for Veterinarians**. p.E1-E3, 2010.

LÖE, H.; SILNESS, J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. **Acta Odontologica Scandinavica**. v.21, n.6, p.533-551, 1963.

LOGAN, E.I.; BOYCE, E.N. Oral health assessment in dogs: parameters and methods. **Journal of Veterinary Dentistry**. v.11, n.2, p.58-63, 1994.

LOGAN, E.I.; FINNEY, O.; HEFFERREN, J.J. Effects of a dental food on plaque accumulation and gingival health in dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**. v.19, p.15-18, 2002.

MICHELL, P.Q. **Odontologia de Pequenos Animais**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2005. 175p.

NADKARNI, M.A.; MATIN, F.E.; JACQUES, N.A.; HUNTER, N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. **Microbiology**, v.148, n.1, p.257-266, 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 2006. In: **Nutrient Requirements of Dogs**. National Academy Press. Washington, p.428.

NISHIYAMA, S.A.B.; SENHORINHO, G.N.A.; GIOSO, M.A.; AVILA-CAMPOS, M.J. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimes of dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p.23-28, 2007.

PERFECTO, D.R.; NAKATA, H.M.; CADILLO, E.M. *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante em la periodontitis crónica. **Odontología Sanmarquina**. v.14, n.1, p.34-38, 2011.

RAHMAN, A.K.M.S.; IBRAHIM, E.M.; ISODA, R.; UMEDA, K.; NGUYEN, V.S.; KODAMA, Y. Effect of passive immunization by anti-gingipain IgY on periodontal health of dogs. **Veterinary Science Development**. v.1, n.8, p.35-39, 2011.

RIGGIO, M.P.; LENNON, A.; TAYLOR, D.J.; BENNET, D. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. **Veterinary Microbiology**. v.150:394-400, 2011.

SILNESS J, LÖE H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.22, p.121-135, 1964.

SCHADE, R.; CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H.R. Chicken egg-yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Atla*, v.33, p.1-26, 2005.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; SANO, K.; HASHIMOTO, K.; OZEKI, M.; TSUDA, K.; HATTA, H. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.56, p.270–274, 1992.

SHIMIZU, Y.; IWASAKI, T.; TAJIMA, T.; YUBA, E.; KONO, K.; WATARAI, S. Induction of antibody response in the oral cavity of dogs following intraocular (eye drop) immunization with *Porphyromonas gingivalis* cell lysate incorporated in pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v.79, n.2, p.290-298, 2017.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**. v.25, p.134-44, 1998.

YOKOYAMA, K.; SUGANO, N.; SHIMADA, T.; RAHMAN, A.K.M.S.; OSHIKAWA, M.; ITO, K. Activity of anti-*Porphyromonas gingivalis* egg yolk antibody against gingipains *in vitro*. **Oral Microbiology Immunology**. v.22, p.352-355, 2007a.

YOKOYAMA, K.; SUGANO, N.; SHIMADA, T.; RAHMAN, A.K.M.S.; IBRAHIM, E.M.; ISODA, R.; UMEDA, K.; NGUYEN, V.S.; KODAMA, Y.; ITO, K. Effects of egg yolk antibody against *Porphyromonas gingivalis* gingipains in periodontitis patients. **Journal of Oral Science**. v.49, n.3, p.201-206, 2007b.

5 APLICAÇÃO DIRETA DE OVO HIPERIMUNIZADO (AI-G®) COMO SUPORTE NO TRATAMENTO DE ANIMAIS ACOMETIDOS POR PARVOVÍRUS.

DIRECT APPLICATION OF HYPERIMMUNIZED EGG (AI-G®) AS A SUPPORT FOR THE TREATMENT OF ANIMALS AFFECTED BY PARVOVIRUS.

5.1 RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar a eficiência da suplementação com AI-G® – imunoglobulinas Y específicas da gema do ovo de galinhas (IgY) no tratamento convencional de animais acometidos por Parvovirose. Doze animais atendidos no Hospital Veterinário Ecoville e diagnosticados com a doença foram utilizados para o estudo. Os animais foram divididos em dois grupos – teste e controle. Aos três primeiros dias de internamento, os animais do grupo teste apresentaram menor valor de escores de sinais clínicos, como letargia, depressão e diarreia. Já na avaliação de hemograma, ao final da fase clínica da doença, aos 15 dias, os animais do grupo teste apresentaram menores quantidades de células de defesa, leucócitos, com relação ao grupo controle. Estes resultados indicam que a suplementação com AI-G® no tratamento convencional clínico é efetivo em promover o suporte contra a Parvovirose. Palavras-chave: Animais de companhia; Gastroenterite; IgY; Imunologia.

5.2 ABSTRACT

The study aimed to evaluate the efficiency of supplementation with AI-G® – specific immunoglobulin derived from chicken egg yolk (IgY) in the conventional treatment of animals affected by parvovirus. Twelve animals treated at Ecoville Veterinary Hospital and diagnosed with the disease were used for the study. The animals were divided into two groups – test and control. The first three days of hospitalization, animals in the test group showed lower scores clinical signs such as lethargy, depression and diarrhea. In the blood tests assessment at the end of the clinical stage of the disease, at 15 days, the animals in the test group had lower amounts of defense cells, leukocytes, in compare with the control group. These results indicate that supplementation with AI-G® in conventional clinical treatment is effective in promoting protection against parvovirus.

Keywords: Companion animals; Gastroenteritis; IgY; Immunology.

5.3 INTRODUÇÃO

A Parvovirose canina é uma das afecções virais mais importantes de cães jovens com menos de 6 meses de idade, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade. A primeira referência sobre a infecção dos cães por um primeiro parvovírus foi feita em 1970, quando Binn & Alii isolaram das fezes de cães assintomáticos quatro amostras de um vírus com pequenas dimensões, o qual foi denominado “vírus minúsculo dos cães”. Porém, somente em 1977 este vírus foi associado a cães (ANGELO et al., 1988).

Com isso, novas alternativas como as imunoglobulinas Y (IgY), anticorpos produzidos por galinhas poedeiras (*Gallus domesticus*), são utilizadas como suporte no tratamento desta doença. Estudos prévios demonstraram que a imunização passiva contra Rotavírus e Coronavírus em animais por meio da administração oral de colostro ou comprimidos de imunoglobulinas derivadas da gema do ovo de galinhas teve resultados promissores, ou seja, animais que tiveram a suplementação com IgY, obtiveram taxas de sobrevivência aumentadas, diarreia reduzida e menor disseminação dos vírus (NGUYEN et al., 2006).

Devido à importância desta doença, este estudo objetivou avaliar a eficiência da suplementação de IgY (AI-G®) em cães diagnosticados com Parvovirose atendidos no Hospital Veterinário Ecoville – Curitiba, Paraná, Brasil.

5.3.1 Parvovirose canina

O Parvovírus, dentre os vírus de tropismo digestivo, vem sendo o mais importante agente etiológico das afecções digestivas, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade no interior das coletividades, estando à alta frequência relacionada com a grande resistência do vírus no meio externo (MENDES et al., 2011).

O agente etiológico da parvovirose canina é um vírus DNA, não envelopado, pertencente à família Parvoviridae, do gênero Parvovírus, denominado parvovírus canino (CPV). Atualmente, existem dois parvovírus de cães: o CPV tipo 1, também denominado parvovírus diminuto de cães, sem importância clínica definida nas gastroenterites (LAMM & REZABEK, 2008), e o CPV tipo 2, que apresenta três

subtipos – CPV2a, CPV2b e CPV2c. O CPV2b é o mais prevalente na população canina e, conseqüentemente, utilizado em vacinas (STROTTMANN et al., 2008).

O parvovírus requer a célula hospedeira para replicação, especificamente o núcleo da célula. A replicação viral ocorre apenas em células que se dividem rapidamente, tais como as células das criptas intestinais epiteliais, células precursoras da medula óssea e miocardiócitos. Conseqüentemente, esta replicação viral resulta em morte celular (GODDARD, 2010).

Os sinais clínicos da infecção incluem diarreia – fezes líquidas ou pastosas (ABDULACK-LOPES, 2012), gastroenterite hemorrágica, vômitos e alta temperatura (CHINCHKAR et al., 2014). Estas condições intestinais levam a desequilíbrio hidroeletrólítico no lúmen intestinal, rápida desidratação e alta mortalidade (GODDARD & LEISEWITZ, 2010).

O período de incubação da doença varia de 7 a 10 dias. Alguns agentes como parasitas, protozoários, patógenos bacterianos e virais, estressores, como o desmame e condições de superlotação e insuficiente imunidade passiva e ativa podem contribuir para o desenvolvimento e a gravidade da doença. Outros fatores como sazonalidade e predisposição racial podem variar geograficamente (KALLI et al., 2010).

Portanto, a utilização de métodos de diagnóstico, tais como avaliação clínica, exames laboratoriais e exames complementares, que permitam evidenciar de forma imediata o agente envolvido, contribui para o estabelecimento do diagnóstico definitivo do agente envolvido, permitindo a adoção de condutas terapêuticas específicas no controle da enfermidade (MENDES et al., 2011).

5.3.2 Imunoglobulinas específicas da gema do ovo de galinhas

As imunoglobulinas são moléculas com alta especificidade para se ligar e inativar substâncias nocivas, como moléculas tóxicas ou antígenos, as quais poderão invadir o corpo. São proteínas que atuam como componentes críticos em cada estágio da resposta imunológica humoral (ALZARI, 1988). Existem cinco classes em mamíferos: IgA, IgM, IgE, IgG e IgD. Em aves existem três classes de imunoglobulinas análogas as dos mamíferos, tais como: IgA, IgM e IgY. A IgA é a classe de imunoglobulina responsável pela defesa das mucosas digestivas, brônquicas e do aparelho genitourinário. A IgM confere resposta de imunidade rápida, porém não muito

efetiva e com duração pequena. Já a IgG tem por atividade biológica a capacidade de atravessar a placenta e as mucosas, sendo assim a atividade de IgY semelhante (SUGITA-KONISHI et al., 1996).

A imunoglobulina IgY é o maior anticorpo produzido por galinhas poedeiras (*Gallus domesticus*). Estes animais são produtores eficientes de anticorpos policlonais em comparação aos mamíferos. O processo de produção consiste em isolamento dessas galinhas, imunização com vacinas intramusculares no músculo peitoral contendo óleo adjuvante com antígeno. Oito semanas após a imunização inicial, uma imunização de reforço é administrada do mesmo modo. Após 60 dias, os ovos imunizados são colhidos e reunidos quando o título de anticorpo atinge o pico nas gemas (EW NUTRITION, 2011). Estes anticorpos provindos da gema do ovo das galinhas representam redução e refinamento no uso de animais. O custo para a produção de IgY é menor do que para anticorpos de mamíferos, pois a habitação de frango é barata e o processo/separação do anticorpo é econômico, com alto rendimento, simples e rápido (KARLSSON et al., 2004).

Frente à alta especificidade, estas imunoglobulinas têm sido utilizadas para realização de diagnósticos, terapia passiva contra infecções e inativação de substâncias tóxicas (KARLSSON et al., 2004), pois o IgY promove o apoio ao sistema imunológico. Tem benefícios em equilibrar a microflora intestinal, promover absorção de nutrientes, reduzir a incidência de estresse induzida por diarreia, dá suporte de proteção da função intestinal, reduz agentes patogênicos e promove a qualidade fecal (EW NUTRITION, 2013).

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Delineamento experimental

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, sob o número de protocolo 12/2015.

Foram utilizados 12 cães atendidos no Hospital Veterinário Ecoville. Os animais foram selecionados para o experimento, sob o consentimento do responsável, com a queixa na anamnese de vômitos, diarreia, depressão e histórico de não vacinação prévia. Após a realização da anamnese, foi realizado o exame diagnóstico de ELISA

- Enzyme linked immunosorbent assay – Ensaio Imunoenzimático (Snap® Parvovirose – IDEXX Laboratories), para a detecção do parvovírus (Figura 18).



FIGURA 18 – SNAP® PARVOVIROSE, COM RESULTADO POSITIVO REALIZADO NO HOSPITAL VETERINÁRIO ECOVILLE, EM PACIENTE PARTICIPANTE DO EXPERIMENTO.

Os cães foram divididos em dois grupos – teste e controle – os animais do grupo teste receberam o comprimido de AI-G®, na dose de 1 comprimido a cada 10 kg, 4 vezes ao dia (QID). Já os animais do grupo controle, receberam o comprimido placebo, também na dose de 1 comprimido a cada 10 kg, QID. O tratamento com AI-G® foi utilizado como suplementação ao tratamento convencional instituído pelo hospital, o qual constitui em: antibioticoterapia, protetor gástrico, anti-emético, anti-pirético e analgésico. Os animais, tanto do grupo controle, quanto do grupo teste, permaneceram internados em área de isolamento no hospital por 3 dias (Figura 19), e após a alta médica, continuaram o tratamento com seus responsáveis.



FIGURA 19 – ESTRUTURA DO ISOLAMENTO, LOCAL AONDE OS ANIMAIS PERMANECERAM INTERNADOS POR 3 DIAS. FONTE: HOSPITAL VETERINÁRIO ECOVILLE, 2015.

Os animais foram avaliados com relação ao exame complementar de hemograma completo aos dias 0 e 15 e avaliação dos sinais clínicos (aos dias 0, 3, 7 e 15), realizadas por escore (tabela 7):

TABELA 7 – ESCORES DE SINAIS CLÍNICOS PARA AVALIAÇÃO DE PACIENTE ACOMETIDO POR PARVOVIROSE.

Sinais Clínicos	Escore
Temperatura	
$\leq 37,3$	1
37,4 – 39,4	0
39,5 – 39,9	1
40,0 – 40,5	2
$\geq 40,6$	3
Fezes	
Muco nas fezes	1
Fezes aquosas	2
Fezes sanguinolentas	3
Sinais gerais	
Anorexia	1
Depressão	1
Letargia	1
Vômitos	1
Tosse	1

FONTE: ADAPTADO DE NGUYEN ET AL., 2006.

5.4.2 Análise estatística

Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado de acordo com a rotina do hospital, cada cão como uma unidade experimental. Os dados obtidos foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade, no programa Statistix®.

5.5 RESULTADOS

Com relação ao escore de sinais clínicos, foi possível observar diferença significativa ($P < 0,05$) em qualidade de fezes e depressão nos animais que receberam a suplementação com AI-G® (tabela 8).

TABELA 8 – MÉDIA DO ESCORE DE SINAIS CLÍNICOS REFERENTES AOS DIAS 0, 3, 7 E 15 EM ANIMAIS DO GRUPO TESTE (AI-G®) E ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE.

	Fezes	Depressão
Dia 0		
Teste	1,50	1,00
Controle	2,00	1,00
P	0,10	1,00
Dia 3		
Teste	0,16	0,16
Controle	1,83	0,83
P	0,01*	0,01*
Dia 7		
Teste	1,16	0,16
Controle	1,33	0,66
P	1,00	0,17
Dia 15		
Teste	0,00	0,00
Controle	0,66	0,00
P	0,01*	1,00

* $P < 0,05$ pelo teste de Kruskal-Wallis.

Quando avaliados somente os animais do grupo controle, foi possível observar que em sinais clínicos avaliados de depressão, letargia, e fezes houve diminuição significativa ($P < 0,05$) ao longo dos dias 0, 3, 7 e 15 (Figura 21). Já nos animais do grupo teste (AI-G®), nestes mesmos sinais clínicos avaliados, também houve diminuição significativa ($P < 0,05$), com diferenças entre as médias dentro do mesmo sinal clínico avaliado (Figura 20).

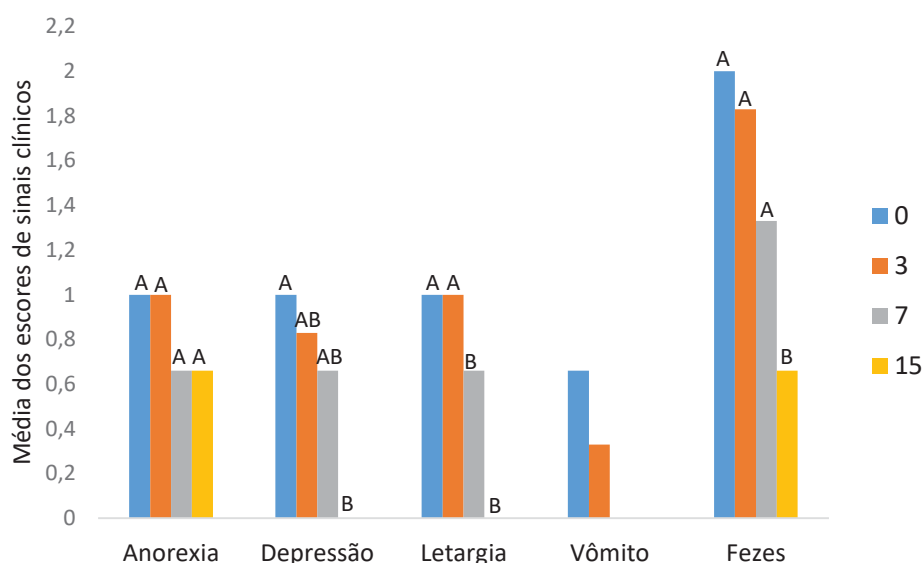


FIGURA 20 – ESCORES DE SINAIS CLÍNICOS AVALIADOS EM CÃES DO GRUPO TESTE (AI-G®) NOS DIAS 0, 3, 7 E 15.

A, B MÉDIAS DISTINTAS DENTRO DE CADA TRATAMENTO SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM PELO TESTE KRUSKAL-WALLIS ($P < 0,05$) ENTRE OS DIAS.

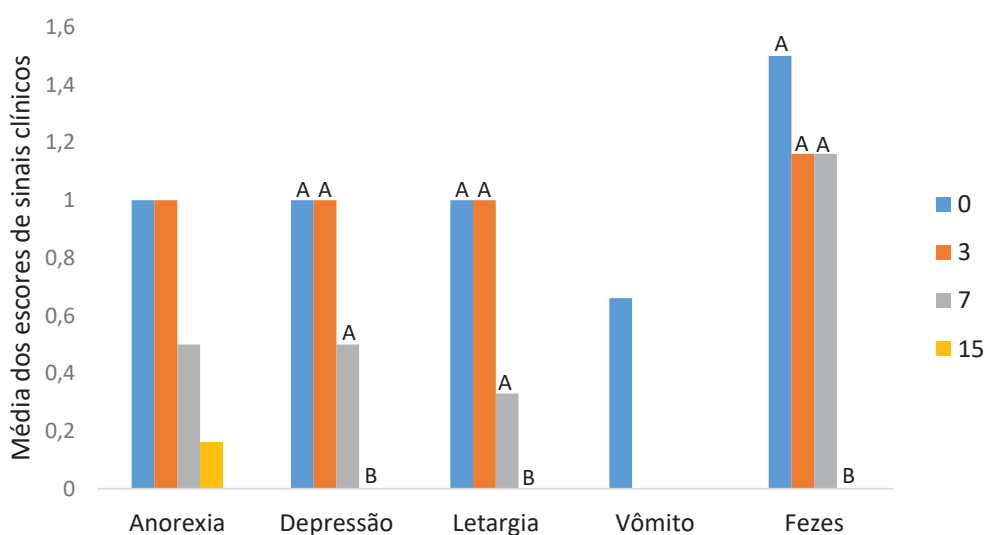


FIGURA 21 – ESCORES DE SINAIS CLÍNICOS AVALIADOS EM CÃES DO GRUPO CONTROLE NOS DIAS 0, 3, 7 E 15.

A, B, AB MÉDIAS DISTINTAS DENTRO DE CADA TRATAMENTO SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM PELO TESTE KRUSKAL-WALLIS ($P < 0,05$) ENTRE OS DIAS.

Com relação à avaliação do hemograma completo, comparando-se os tratamentos no dia 0 e 15, foi possível observar que no dia 15 houve menor nível de proteína plasmática e leucócitos nos animais do grupo teste (AI-G®), assim como maior número de linfócitos no grupo controle, conforme tabela 9.

TABELA 9 – VALORES DAS MÉDIAS DE PARÂMETROS AVALIADOS NO HEMOGRAMA REFERENTE AOS DIAS 0 E 15 EM ANIMAIS DO GRUPO TESTE (AI-G®) E ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE.

	Eritrócitos (milhões/ μ L)	Hematócrito (%)	Proteína Plasmática (g/dL)	Leucócitos / μ L	Linfócitos / μ L	Neutrófilos bastonetes / μ L	Eosinófilos / μ L
Dia 0							
Teste	4,8	35,8	5,5	7,0	6,3	8,2	7,5
Controle	8,2	45,5	7,5	6,0	6,7	4,8	5,5
P	0,11	0,18	0,35	0,65	0,88	0,11	0,30
Dia 15							
Teste	4,5	41,2	3,5	3,7	3,8	4,5	4,4
Controle	6,0	51,3	8,0	7,7	7,3	6,0	6,2
P	0,47	0,08	0,01*	0,02*	0,06	0,46	0,39

* $P < 0,05$, indica diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis.

Também foi avaliada a taxa de óbito nos animais. Foi possível observar que após três dias, dois animais do grupo controle vieram a óbito, enquanto os animais do grupo teste não apresentaram óbito (Figura 22).

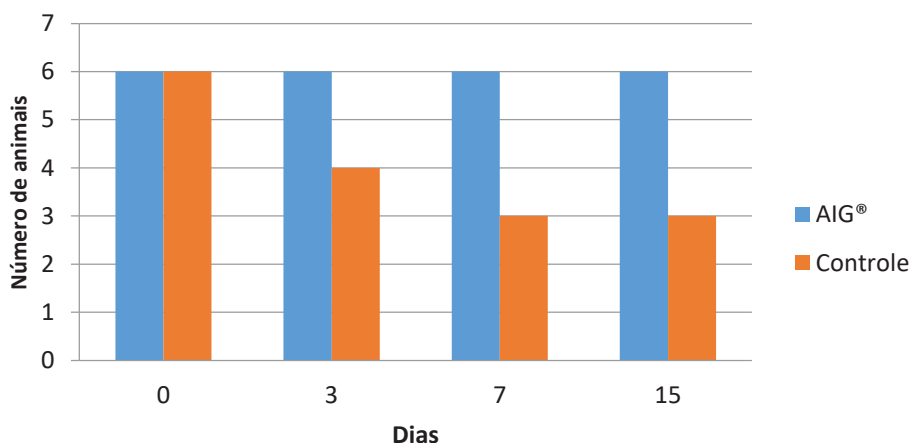


FIGURA 22 – TAXA DE ÓBITOS NOS ANIMAIS DO GRUPO TESTE (AI-G®) E GRUPO CONTROLE, AO 0, 3, 7 E 15 DIAS.

5.6 DISCUSSÃO

O aumento de bactérias resistentes aos antibióticos e o desejo de tratar patógenos que não fazem respostas aos antibióticos, tais como patógenos virais,

promoveu a investigação sobre a utilização de anticorpos como uma alternativa aos tratamentos convencionais (KARLSSON et al., 2004).

A infecção de cães com parvovírus resulta em doença entérica altamente contagiosa e com alta taxa de morbidade e mortalidade (WILSON et al., 2014). Embora o tratamento adequado seja frequentemente bem-sucedido, a taxa de sucesso tem permanecido praticamente inalterada ao longo dos anos, refletindo uma clara necessidade de terapia mais eficaz que diminua a morbidade e o tempo de hospitalização, que aumente a taxa de sobrevivência e que reduza o custo do tratamento, tornando-o economicamente mais viável tanto para os proprietários como para as instituições protetoras (FERREIRA, 2011). No presente estudo, nós investigamos a eficiência da suplementação com IgY (AI-G®) ao tratamento convencional clínico contra a parvovirose, com o objetivo de avaliar a recuperação dos animais por meio dos sinais clínicos e hemograma. Foi possível observar (tabela 8) que após três dias de fornecimento da suplementação com IgY os animais do grupo teste já obtiveram melhora clínica no escore de fezes, tornando-as mais formadas e com ausência de diarreia. Resultados que corroboram com Nguyen e colaboradores (2006), em seus estudos, os pesquisadores forneceram o tratamento com IgY em cães com Parvovirose. Em comparação com o grupo controle, o grupo teste não obteve sinais clínicos de vômito e diarreia.

As figuras 20 e 21 mostram a avaliação de sinais clínicos como depressão, letargia e fezes diarreicas no grupo teste e controle aos dias 0, 3, 7 e 15. De acordo com Goddard & Leisewitz (2010), enterite aguda é a manifestação mais comum da doença e é principalmente observada em filhotes com média de 6 meses de idade. Os sinais clínicos iniciais são inespecíficos e incluem anorexia, depressão, letargia e febre, mais tarde, sinais típicos incluem vômitos e diarreia. Em nosso estudo, animais do grupo teste apresentaram melhoras clínicas significativas (figura 20) após três dias do recebimento da IgY (AI-G®), o que não foi possível observar nos animais do grupo controle (figura 21), os quais necessitaram de maior tempo de recuperação, alcançando a melhora clínica em torno de 15 dias. Dados que concordam com os resultados encontrados por Nguyen e colaboradores (2006), onde animais que receberam IgY como tratamento não demonstraram sinais clínicos de vômito e diarreia em comparação ao grupo controle.

Os animais que receberam a IgY (AI-G®) tiveram taxa de sobrevivência de 100%, o que não foi possível observar nos animais do grupo controle, os quais apresentaram taxa de sobrevivência de 50% (figura 22). Em seu estudo, Ferreira (2011) enfatiza a importância de um tratamento eficaz e seguro, pois a alta taxa de morbidade e mortalidade da doença ainda é um problema atual. Ainda que os sinais clínicos da parvovirose possam ser autolimitantes, o desenvolvimento de doença fulminante e morte ocorrem em muitos cachorros infectados.

Com relação aos parâmetros avaliados de hemograma, as células da série vermelha, tais como contagem de eritrócitos e valores de hematócrito (tabela 9), hemoglobina, índices hematimétricos (VGM e CHGM) e plaquetas (dados não demonstrados) se encontraram dentro dos padrões de normalidade estabelecidos para a espécie (GARCIA-NAVARRO, 2005).

Já com relação às proteínas plasmáticas, nos animais do grupo controle, podemos observar valores aumentados ($P < 0,05$). Os valores de proteínas aumentadas sugerem situações de desidratação, processos inflamatórios e infecciosos (FERREIRA, 2011).

Foi possível observar que os animais do grupo controle apresentaram o número de leucócitos, células de série branca responsáveis por defender o organismo contra infecções, maior (leucocitose) ($P < 0,05$) que os animais do grupo teste. Isso pode sugerir que os animais ainda se encontravam em situação de estresse de doença, o qual o número destas células brancas de defesa se encontra maior (ABBAS et al., 2013). Carman & Povey (1985) também encontraram valores de leucocitose em cães após a inoculação do parvovírus em cinco dias, e pode-se observar também leucocitose em condições de convalescença. Em 60% dos casos de parvovirose canina aguda, foi observada leucopenia, com desvio à esquerda no exame hematológico inicial e em 100% dos casos, entre o segundo e terceiro dia de evolução da doença, com normalização ou tendência à leucocitose entre o quinto e oitavo dia, indicando-se assim, o caráter agudo do processo inflamatório decorrente da infecção (MENDES et al., 2011).

5.7 CONCLUSÃO

O uso de terapia específica, como as imunoglobulinas Y (AI-G®), anticorpos produzidos por galinhas poedeiras (*Gallus domesticus*), como suporte no tratamento

de doenças virais – Parvovirose, é uma alternativa promissora para o sucesso e aumento de sobrevivência de pacientes.

5.8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., PILLAI, S. **Imunologia Básica – Funções e distúrbios do sistema imunológico**. 1.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

ABDULACK-LOPES, F. Resposta imune ao parvovírus canino tipo2 (CPV 2) em hidrogel de quitosana administrado via sublingual. **Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo**, 2012.

ALZARI, P.M., LASCOMBE, M.B., POLJAK, R.J. Three-Dimensional structure of antibodies. **Annual Review of Immunology**, v.6, p. 555-580. 1988.

ANGELO, M.J.O., HAGIWARA, M.K., JULY, J.R., CARVALHO, R.P.S., BACCARO, M.R. Isolamento de parvovírus canino no Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo**, v.25, n.1, p.123-134, 1988.

CARMAN, P.S.; POVEY, R.C. Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: haematology, serology and virus recovery. **Research in Veterinary Science**, v.38, p.134-140, 1985.

CHINCHKAR, S.R., SUBRAMANIAN, B.M., NAIDU, H., THIAGARAJAN, D., SRINIVASAN, V.A. Canine parvovirus isolates of India and the relevance of canine parvovirus type-2 vaccines. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v.4, n.1, p.34-41, 2014.

EW NUTRITION. **Presentation Globigen® Oral Care**. Visbek, Germany. 2011.

EW NUTRITION. **Presentation Globigen® Intestinal Care**. Visbek, Germany. 2013.

FERREIRA, M.O. Diferentes abordagens terapêuticas em cães com parvovirose – caracterização do uso de antibióticos. **Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa**. 2011.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K. **Manual de Hematologia Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Varela, 2005.

GODDARD, A., LEISEWITZ, A.L. Canine Parvovirus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.40, p.1041-1053, 2010.

KALLI, I., LEONTIDES, L.S., MYLONAKIS, M.E., ADAMAMA-MORAITOU, K., RALLIS, T., KOUTINAS, A.F. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.174-178, 2010.

KARLSSON, M., KOLLBERG, H., LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Association**, v.60, p.341-348, 2004.

LAMM, C.G., REZABEK, G.B. Parvovirus infection in domestic companion animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.38, n.4, p.837-850, 2008.

MENDES, R.S.; DE SOUZA, A.P., DA SILVA, R.M.N., BORGES, O.M.M., TORRES, L.M., DANTAS, A.K.F.P. Perfil hematológico e bioquímico de cães com gastroenterite hemorrágica por parvovírus diagnosticados pelo método de imunocromatografia. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p.278-283, 2011.

NGUYEN, S.V., UMEDA, K., YOKOYAMA, H., TOHYA, Y., KODAMA, Y. Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, p.62-64, 2006.

STROTTMANN, D.M., SCORTEGAGNA, G., KREUTZ, L.C., BARCELLOS, L.J.G., FRANDOLOSO, R., ANZILIERO, D. Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.38, n.2, p.400-405, 2008.

SUGITA-KONISHI, Y., SHIBATA, K., YUN, S.S., HARA-KUDO, Y., YAMAGUCHI, K., KUMAGAI, S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.60, n. 5, p. 886-888, 1996.

WILSON, S., ILLAMBAS, J., SIEDEK, E., STIRLING, C., THOMAS, A., PLEVOVÁ, E., STURE, G., SALT, J. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralizing antibody responses to CPV-2a and CPV-2c. **Vaccine**, v.32, p. 5420-5424, 2014.

6 AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES EM SEPSE ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO POMPEIA COM A INCLUSÃO DE IgY (AI-G®) AO TRATAMENTO CONVENCIONAL.

EVALUATION OF CLINICAL RECOVERY OF PATIENTS IN SEPSE AT THE POMPEIA VETERINARY HOSPITAL WITH THE INCLUSION OF IgY (AI-G®) TO THE CONVENTIONAL TREATMENT.

6.1 RESUMO

O suporte para animais internados em hospitais veterinários é de extrema importância para o sucesso do tratamento. Buscar novas alternativas que auxiliem os médicos veterinários, assim como estudar novos tratamentos para melhorar a qualidade de vida e aumentar a chance de sobrevivência dos pacientes internados é o objetivo dos pesquisadores nesta área. Com isso, a inclusão de imunoglobulina Y (IgY, AI-G®) para combater as diversas doenças nos animais vem mostrando sucesso nos animais de companhia. A sepsé é uma síndrome clínica que pode ser definida pela invasão de microrganismos (vírus, fungos ou bactérias) ou de suas toxinas na circulação sanguínea associada à resposta inflamatória sistêmica (SIRS) do organismo à essa invasão. Portanto, para combatê-la, a inclusão de IgY ao tratamento convencional foi estipulada com o objetivo de diminuir o número de óbitos dos animais, assim como buscar a normalidade dos níveis séricos de glicose e lactato.

Palavras-chave: animais de companhia; atendimento hospitalar; glicose; lactato; septicemia.

6.2 ABSTRACT

The support for animals admitted in veterinary hospitals is extremely important for successful treatment. Finding new alternatives to assist veterinarians, as well as studying new treatments with the objective of improving the quality of life and increasing the survival chances of these hospitalized patients is the aim of researchers in this area. Thus, the inclusion of immunoglobulin Y (IgY, AI-G®) to combat several diseases in animals has been shown to be successful in companion animals. Sepsis

is a clinical syndrome that can be defined by the invasion of microorganisms (viruses, fungi or bacteria) or their toxins into the bloodstream associated with the systemic inflammatory response (SIRS) of the organism to this invasion. Therefore, to combat it, the inclusion of IgY to the conventional treatment was stipulated with the purpose of reducing the number of deaths of the animals, as well as to seek the normality of serum levels of glucose and lactate.

Keywords: companion animals; hospital care; glucose; lactate; sepsis.

6.3 INTRODUÇÃO

A utilização de imunoglobulina Y (IgY), análoga à imunoglobulina G em mamíferos, como auxílio na terapêutica veterinária cresce a cada dia. O aumento da resistência bacteriana à antibióticos e o desejo de combater patógenos que não respondem à antibióticos, como patógenos virais, tem promovido a pesquisa de imunoglobulinas (KARLSSON et al., 2004). O conceito de imunidade passiva por transferir anticorpos específicos para a gema do ovo em galinhas poedeiras foi demonstrado primeiramente por Klemperer em 1893, e a IgY se refere à anticorpos de galinhas contra antígenos específicos, os quais são transferidos para a gema do ovo. Com isso, a IgY é utilizada na indústria com o objetivo de contribuir para a imunoterapia do trato gastrointestinal, se ligando à bactérias, vírus e protozoários e inibem a fixação e replicação de agentes patogênicos na parede intestinal, contribuindo para manutenção da saúde intestinal (KARLSSON et al., 2004).

Atualmente, na medicina humana, é cada vez maior o número de estudos envolvendo pacientes em estado grave, principalmente com relação ao controle da glicemia e lactato. Sabe-se que a hiperglicemia é comum no homem com sepse, doenças cardíacas, queimaduras e trauma craniano, e estudos recentes têm demonstrado que o controle na glicemia tem reduzido a mortalidade em pacientes críticos (REINOLDES, 2011). A sepse também tem sido diagnosticada na medicina veterinária e é responsável por alta mortalidade em unidades de terapia intensiva em clínicas veterinárias, sendo de grande importância intervenções imediatas para seu controle e tratamento (BARBOSA, 2016).

A sepse é uma síndrome clínica que pode ser definida pela invasão de microrganismos (vírus, fungos ou bactérias) ou de suas toxinas na circulação sanguínea associada à resposta inflamatória sistêmica (SIRS) do organismo à essa

invasão (REINOLDES, 2011). A SIRS pode apresentar variáveis gerais, tais como hipertermia ou hipotermia, taquicardia, taquipneia, alteração do nível de consciência, edema significativo ou balanço hídrico positivo maior que 20mg/kg após 24 horas e hiperglicemia na ausência de diabetes; variáveis inflamatórias, como leucocitose, leucopenia ou leucograma normal; variáveis hemodinâmicas como hipotensão arterial e a saturação venosa mista de oxigênio menor que 70%; variáveis de perfusão tecidual e de falência orgânica como hipoxemia arterial, oligúria aguda, aumento dos níveis séricos de creatinina, distúrbios de coagulação, trombocitopenia e hiperbilirrubinemia (LEVY et al., 2003; CONTI-PATARA, 2009).

Portanto, o presente trabalho objetivou traçar um perfil epidemiológico e avaliar a recuperação de pacientes com sepse recebendo a inclusão de IgY ao tratamento convencional.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Animais e instalações

Foi realizado um estudo duplo cego com 54 animais divididos em dois grupos (G1 e G2) e atendidos na unidade de terapia intensiva do Hospital Veterinário Pompeia. Após a coleta total dos dados, foi revelado os tratamentos em cada grupo: G1 – animais em tratamento com comprimidos AI-G®, e grupo G2 – animais em tratamento com comprimidos placebo.

Os animais receberam o tratamento convencional estabelecido pelo HOVET Pompeia e a adição dos comprimidos por via oral, na posologia de 1 comprimido para animais com até 10Kg a cada 4 horas, durante o período de internamento.

6.4.2 Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk com relação à normalidade. Após, foi realizado o teste de Mann-Whitney-Wilcoxon no programa estatístico Statistix 8, a 10% de probabilidade.

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais atendidos no Hospital Veterinário Pompeia apresentaram diagnóstico, idade e raça variadas. O diagnóstico de maior frequência foi

gastroenterite hemorrágica (40,35%), seguido por pancreatite (14,03%), neoplasia em TGI (8,77%) e piometra (5,26%). Foram atendidos animais com 3 meses até 17 anos de idade. A maior faixa etária de pacientes atendidos foi de 12 anos (7 casos), como demonstrado na figura 23. Já com relação às raças (figura 24), animais sem raça definida (SRD) foram a maioria dos atendimentos (6 atendimentos), seguido por raças, como Labrador, Lhasa-apso e Poodle (4 atendimentos cada).

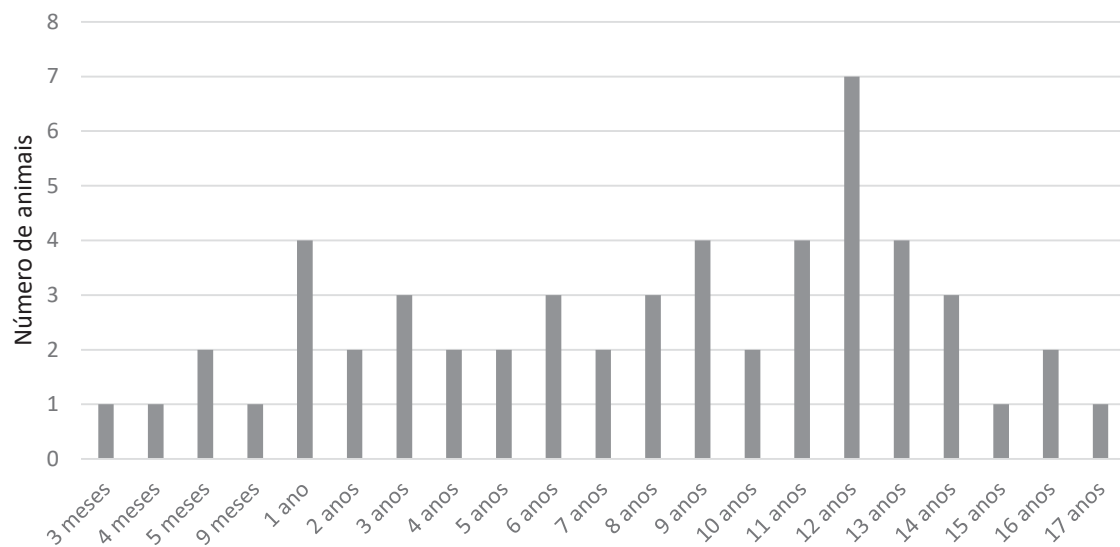


FIGURA 23 – IDADE DOS ANIMAIS ATENDIDOS NO HOVET POMPEIA.

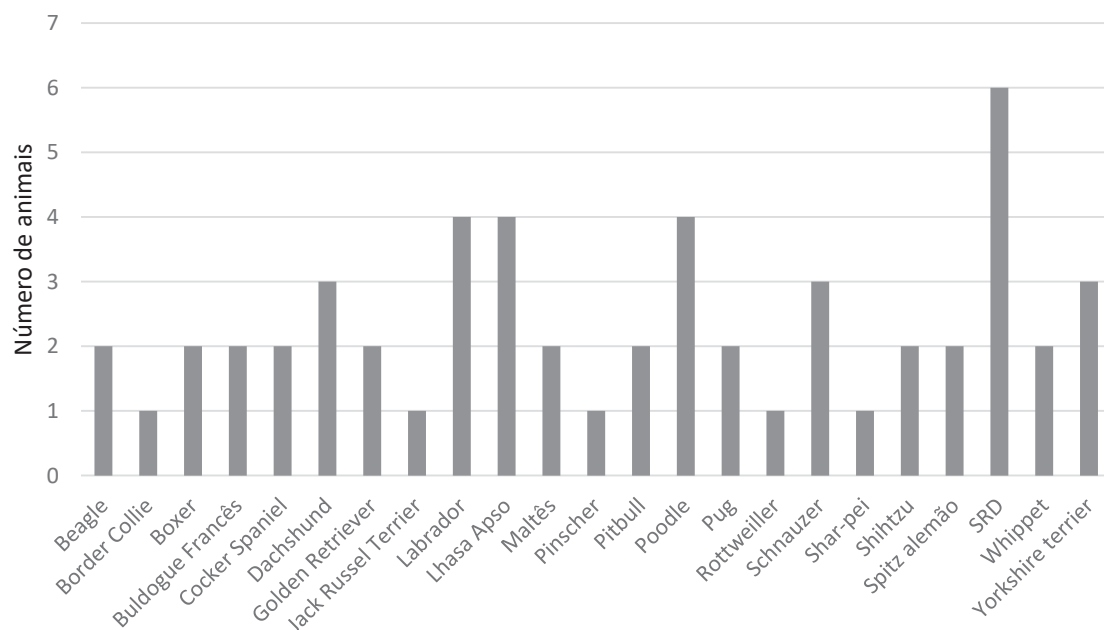


FIGURA 24 – RAÇAS DE CÃES ATENDIDOS NO HOVET POMPEIA.

Os animais que receberam a IgY (AI-G®) como tratamento suplementar ao convencional não apresentaram óbitos, enquanto os animais que receberam o comprimido placebo, apresentaram no total 7 óbitos conforme demonstrado na figura 25. A IgY adicionada ao tratamento convencional estipulado pelo médico veterinário, promove o apoio ao sistema imunológico pois possui o mecanismo de ação que depende do contato intermolecular com o antígeno. Com isso, a IgY tem sido demonstrada em diversos estudos com a efetividade de reduzir significativamente a carga de patógenos infecciosos até um ponto em que a própria imunidade do paciente possa eliminar a causa da doença e realizar a proteção do hospedeiro (RAHMAN et al., 2013).

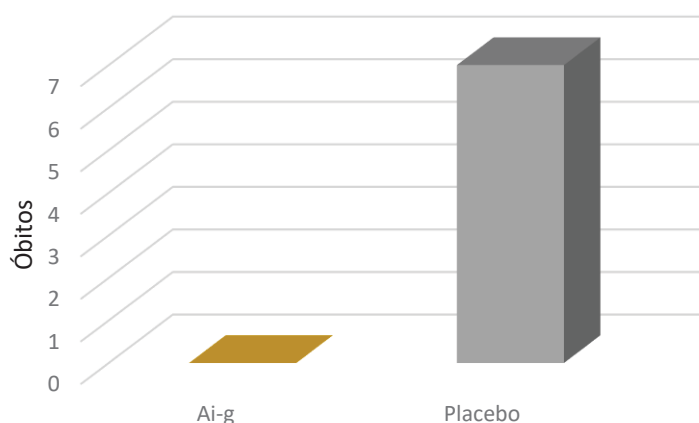


FIGURA 25 – NÚMERO DE ÓBITOS EM ANIMAIS QUE RECEBERAM SUPLEMENTAÇÃO COM IGY (AI-G®) E ANIMAIS QUE RECEBERAM O PLACEBO.

A tabela 10 demonstra os valores de médias de glicose e lactato encontrados nos animais estudados num período de 24 horas. A avaliação destes parâmetros em pacientes com sepse é de fundamental importância, pois auxiliam o médico veterinário com relação ao quadro clínico do paciente. A glicose é o principal combustível utilizado no sistema nervoso central. As reservas de carboidrato no tecido nervoso são limitadas e o funcionamento normal destas células depende do aporte contínuo de glicose, de fontes situadas fora do SNC. Se a concentração da glicose sanguínea é reduzida para valores abaixo de nível crítico, ocorrerá disfunção do sistema nervoso (HESS, 2010).

Em contrapartida, a hiperglicemia é comum em animais na fase inicial da sepse. O paciente grave tem um aumento catabólico que demanda energia, ocorrendo assim,

degradação de glicogênio. Este estado é caracterizado por hiperglicemia, hiperlactatemia e aumento da demanda de oxigênio (REINOLDES, 2010).

TABELA 10 – VALORES DE MÉDIAS DE GLICOSE (MG/DL) E LACTATO (MMOL/L) AVALIADOS NOS TEMPOS 0, 2, 6, 12 E 24 HORAS EM PACIENTES DO GRUPO TESTE (AI-G®) E PLACEBO (CONTROLE).

	Glicose (mg/dL)					Lactato (mmol/L)				
	0	2	6	12	24	0	2	6	12	24
AI-G®	100,04	106,31	110,65	109,91	116,42	3,13	2,50	2,79	2,40	1,90
Placebo	96,44	117,19	118,76	126,50	118,31	3,20	3,21	3,34	2,46	3,93
P	0,28	0,08	0,11	0,001	0,36	0,34	0,002	0,15	0,17	0,17

Valores de P menor que 0,10 avaliados pelo teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, indicam diferença estatística.

A sepse na fase inicial promove a liberação de hormônios hiperglicemiantes entre eles o cortisol e o glucagon, promovendo aumento da glicemia. Esta hiperglicemia é prejudicial causando redução da função imune, aumento do processo inflamatório e da função normal do endotélio (REINOLDES, 2011). Em nosso estudo, ao comparar os dois grupos de animais, é possível observar que os valores de glicose se mantêm próximos nos animais que receberam a IgY (AI-G®) como suplementação ao tratamento convencional, enquanto que no grupo placebo, houve um aumento desses valores séricos quando comparamos os dois grupos (2 e 12 horas de avaliação, $p < 0,10$). A importância de manter os níveis de glicose próximos à normalidade é fundamental para a função orgânica do paciente e é mantida por meio do equilíbrio entre a produção de hormônios como a insulina e o glucagon, adrenalina, cortisol e o hormônio do crescimento (CONTI-PATARA, 2009).

A detecção e correção da hipóxia tecidual também são fundamentais para pacientes severamente doentes e a medida do lactato sanguíneo como indicador indireto da oxigenação dos tecidos já é utilizado em medicina humana há mais de 30 anos se tornando uma ferramenta extremamente útil em hospitais veterinários (BELLETINI et al., 2008). Após 2 horas do início da inclusão de IgY (AI-G®) é possível observar uma diferença ($p < 0,10$) dos níveis de lactato com relação aos pacientes do grupo placebo. O aumento das concentrações séricas de lactato promove redução do pH sanguíneo caracterizando um quadro de acidose láctica. Portanto, a mensuração do lactato é um parâmetro importante na avaliação da perfusão tecidual, pois elevados

valores de lactato em pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva são associados com prognósticos ruins (KITSIS, 2010; FRANCO et al., 2016).

6.6 CONCLUSÃO

Com os dados expostos, é possível concluir que a IgY (AI-G®) é efetiva para melhorar a recuperação clínica e normalizar os níveis séricos de glicose e lactato, assim como diminuir o número de óbitos em animais acometidos com diferentes patologias e em estado de sepse. A IgY auxilia o sistema imunológico do animal a atuar frente à doença, pois a ligação direta deste anticorpo ao antígeno representa uma estratégia potencial para o tratamento de diversas doenças dentro da medicina veterinária.

6.7 REFERÊNCIAS

BARBOSA, B.C., ALVES, F.S., BEIER, S.L., FALEIROS, R.R., FREITAS, P.M. Fisiopatologia e terapia do cão com sepse: revisão. **Pubvet – Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.10, n.1, p.13-20, 2016.

BELETTINI, S.T; ALBERTON, L.R; SILVA, R.P.B; STEL, R.F; LOURENÇO, W.S; PACHALY, J.R. Avaliação dos níveis séricos de lactato em cães submetidos a anestesia dissociativa. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia – Unipar, Umuarama**, v. 11, n.2, p. 87-95, 2008.

BOLLER, E.M., OTTO, C.M. **Septic shock**. In: SILVERSTEIN, D.C., HOOPER, K. Small Animal Critical Care Medicine. St. Louis: Saunders, 2009. p. 454-458.

CONTI-PATARA, A. Evolução dos valores de saturação venosa central de oxigênio, lactato e déficit de base em cães com sepse grave e choque séptico submetidos à ressuscitação volêmica precoce. **Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2009. 102p.

FRANCO, R.P., MASSUFARO, C.R., MARTINELLI, J., GIROTTI, C.H., HIROTA, I.N., ZACHE, E., HATAKA, A. Valores de lactato sérico e sua correlação com parâmetros clínicos de cães saudáveis, mensurados durante atendimento ambulatorial veterinário. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.6, p.509-515, 2016.

HESS, R.S. **Insulin-secreting islet cell neoplasia**. In: ETTINGER, S.J.; FELDMANN, E.C. Text book of veterinary internal medicine. 7th ed. Philadelphia: W B Saunders, 2010. p. 1779-1782.

KARLSSON, M., KOLLBERG, H., LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Association**, v.60, p.341-348, 2004.

KITSIS, M. Avaliação de complicações pulmonares em cães com sepse grave submetidos à terapia intensiva. **Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010. 96p.

KLEMPERER, F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v.31, p.356-382, 1893.

RAHMAN, S.; NGUYEN, S.V.; ICATLO JR, F.C.; UMEDA, K.; KODAMA, Y. Oral passive IgY-based immunotherapeutics. A novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.9, n.5, p.1039–1048, 2013.

REINOLDES, A. Avaliação dos níveis de glicose, insulina, cortisol e glucagon em cães com sepse grave submetidos ao tratamento intensivo. **Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia**, São Paulo, 2011. 101p.

7 INCLUSION OF SPECIFIC CHICKEN IGY IN DIET HAS MODERATE IMPACT ON THE INTESTINAL MICROBIAL FERMENTATION IN DOGS.

INCLUSÃO DE IgY ESPECÍFICA TEM IMPACTO MODERADO NA FERMENTAÇÃO BACTERIANA INTESTINAL DE CÃES.

7.1 RESUMO

As imunoglobulinas Y (IgY) são os principais anticorpos produzidos pelas galinhas poedeiras. Eles são transferidos para a gema de ovo, onde se acumulam. O uso de IgY na alimentação animal é uma alternativa para a prevenção e tratamento de doenças intestinais. Com o objetivo de avaliar o efeito da IgY na saúde sistêmica e no trato gastrointestinal de cães, dezesseis cães Beagle saudáveis de 11 meses de idade foram distribuídos aleatoriamente (oito animais por tratamento) em dois grupos: controle (0 g/kg de IgY) e teste (2 g/kg de IgY). Os animais foram avaliados nos dias 0 e 40 para hemograma completo e perfis bioquímicos (ALT, ALP, Creatinina e Ureia). As amostras fecais foram coletadas nos dias 35 a 40 para medir a digestibilidade dos nutrientes, características fecais (escore fecal e nitrogênio amoniacal), ácido siálico, composição de microbiota intestinal e produtos de fermentação bacteriana. O hemograma, perfis bioquímicos, digestibilidade aparente de nutrientes e características fecais não diferiram entre os dois tratamentos ($P > 0,05$). As fezes de cães que receberam IgY foram caracterizadas por menor concentração de ácido siálico e *n*-valérico, bem como um aumento na concentração de *n*-butírico em comparação com cães alimentados com dieta sem IgY ($P < 0,05$). Os outros produtos de fermentação bacteriana não diferiram entre os dois tratamentos ($P > 0,05$). Houve uma tendência para um aumento no número de cópias do grupo *Clostridium* XIVa (grupo *C. coccoides*) no grupo IgY em comparação com o grupo controle ($P = 0,07$). As outras bactérias analisadas não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,05$). O pH colônico no grupo IgY foi menor do que no grupo controle ($P < 0,05$). A adição de IgY na dieta de cães saudáveis mantém o equilíbrio microbiano e pode ter um efeito interessante sobre os produtos de fermentação bacteriana. Estudos adicionais, incluindo cães doentes, devem ser considerados para avaliar o potencial da IgY contra as disfunções intestinais e doenças.

Palavras-chave: animais de companhia; imunoglobulina Y; microbiota fecal; ovo hiperimunizado.

7.2 ABSTRACT

Immunoglobulins Y (IgY) are the major antibodies produced by laying hens. They are transferred to the egg yolk in which they accumulate. The use of IgY in animal feed is an alternative for the prevention and treatment of intestinal diseases. With the aim to evaluate the effect of IgY in the systemic health and gastrointestinal tract of dogs, sixteen healthy 11-month-old Beagle dogs were distributed at random (eight animals per treatment) in two treatments groups: control (0 g/kg IgY) and test (2g/kg IgY). The animals were evaluated on days 0 and 40 for a complete blood count (CBC) and biochemical profiles (ALT, ALP, Creatinine and Urea). Fecal samples were collected on days 35-40 to measure nutrient digestibility, fecal characteristics (fecal score and ammonia nitrogen), sialic acid, intestinal microbiota composition and microbial metabolites. The CBC, biochemical profiles, apparent nutrient digestibility and fecal characteristics did not differ between the two treatments ($P>0.05$). Feces of dogs receiving IgY were characterized by lower sialic acid and *n*-valeric concentration, as well as an increase in *n*-butyric concentration compared to dogs fed diet without IgY ($P<0.05$). The other microbial fecal metabolites did not differ between the two treatments ($P>0.05$). There was a tendency for an increase in the copy number of *Clostridium* cluster XIVa (*C. coccoides* group) in IgY group compared to the control group ($P=0.07$). The other bacteria analyzed did not differ between the treatments ($P>0.05$). The colonic pH in IgY group was lower than in control group ($P<0.05$). The addition of IgY in the diet of healthy dogs maintains the microbial balance and might have an interesting effect on microbial metabolites. Further studies including sick dogs should be considered to assess the potential of IgY to improve intestinal dysfunctions and diseases.

Keywords: Companion animals; fecal microbiota; hyperimmunized hen egg yolk; immunoglobulin Y.

7.3 INTRODUCTION

Several feed additives and ingredients have been studied to promote health of humans and animals, and among them, immunoglobulins Y (IgY) are considered to play an important role in keeping the dogs healthy. Three immunoglobulin classes have been shown to exist in the chicken: IgA, IgM and IgY. The IgA and IgM of chickens are homologues of mammalian IgA and IgM, whereas IgY is the functional equivalent to mammalian IgG and is the predominant immunoglobulin in birds, reptiles and amphibians. In the female bird, IgY is transferred from the serum into the egg yolk to embryos and neonates, a process that corresponds to the placental IgG transfer in mammals (Karlsson et al., 2004; Zhang, 2003).

In 1893, Felix Klemperer first described an experiment in which he demonstrated that the immunization of a hen caused the transfer of specific antibodies into the egg yolk. IgY, prepared as egg powder lyophilized product, is an interesting source of specific immunoglobulins and, because of this, the heat stability is important for the production. The oral use of the IgY as components of functional diet also makes it necessary to investigate the stability of IgY in relation to pH, as well as molecular resistance to proteolytic cleavage under conditions met during the passage through the stomach and the small intestine (Schade et al., 2005). IgY is stable at temperatures ranging between 30°C and 70°C, and the addition of sorbitol, disaccharide, alkaline (sodium bicarbonate) or protein rich (egg white, egg yolk) solutions strongly increased the resistance of IgY to acid or proteolytic inactivation (Hatta et al., 1993; Lee et al., 2002; Nilsson & Larsson, 2007).

IgY has a wide range of application, such as immune system support during critical periods, enhances intestinal health and improve the oral health of teeth and gums (Karlsson et al., 2004). IgY is also effective in preventing diseases caused by many pathogens in gastrointestinal tract. Sugita-Konishi et al. (1996) showed that IgY is capable of inhibiting the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, the production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin-A, and the adhesion of *Salmonella enteritidis* to cultured human intestinal cells. However, studies about the effects of specific IgY on gut health of dogs are lacking and therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of IgY antibodies against enteric bacteria such as *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. and *Escherichia coli* (Globigen IC®, GRASP | EW Nutrition) incorporated in feed on the systemic health and gastrointestinal tract of dogs.

7.4 MATERIAL AND METHODS

7.4.1 Animals and facilities

Sixteen 11-month-old Beagle dogs (eight males and eight females) with 9.60 ± 0.76 kg average body weight were distributed in a completely randomized design. The dogs underwent clinical evaluations that attested good health, were vaccinated and dewormed before the experiment, and housed in concrete kennels. The animals received the same diet for 7 days for adaptation and, after this time, were divided into 2 treatment groups: control (0 g/kg IgY) and test (2g IgY/day). Dogs were fed a basic commercial diet during their growth phase (Table 11) according to their maintenance energy requirements (ME) (NRC, 2006).

TABLE 11 – INGREDIENTS AND ANALYZED CHEMICAL COMPOSITION (% NATURAL MATTER) OF COMPLETE FEED FOR DOGS.

Ingredients	(g/kg)
Corn	300
Poultry fat	117.4
Soybean meal 46%	150.0
Protenose	170.0
Poultry viscera flour	220.0
Salt	5.0
Flavoring	30.0
BHA	0.08
BHT	0.170
Citric acid	0.350
Calcium propionate	2.0
Choline chloride	2.0
Mineral-vitamin premix*	3.0
Analyzed chemical composition	(% DM)
Dry matter	95.04
Crude protein	36.78
Crude fat	17.05
Crude ash	6.94
Crude fiber	3.91
Available starch	34.96
Resistant starch	5.08
Total starch	40.04

* Mineral-vitamin premix, enrichment per kg: vitamin A (retinol) = 20.000 IU; vitamin D3 = 2000 IU; vitamin E (alfa-tocopherol, α) = 48 mg; vitamin K3 = 48 mg; vitamin B1= 4 mg; vitamin B2 = 32 mg; pantothenic acid = 16 mg; niacin = 56 mg; choline = 800 mg; zinc oxide, Zn = 150 mg; ferrous sulphate, Fe = 100 mg; cooper sulphate; Cu = 15 mg; Potassium iodide, I = 1.5 mg; Manganese oxide, Mn = 30mg; sodium selenite, Se = 0.2 mg; antioxidant = 240 mg.

Tablets of IgY (1g of IgY) and tablets of placebo containing the same constituents but without IgY (0g of IgY) were administered orally together with the diet, twice a day, at 7.00am and 7.00pm for 40 days. The IgY used has specific immunoglobulins for enteric bacteria, such as *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. and *Escherichia coli*. The dosage used followed the company's recommendations, which included 1 to 5g/animal/day. Water was offered *ad libitum*.

The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the sector of Agrarian Sciences of the Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil, under case no. 012/2015.

7.4.2 Microbiota profile

DNA was extracted and amplified by quantitative PCR (qPCR) with primers specific for certain microorganisms to assess the microbiota in feces. Fresh fecal samples were collected aseptically (immediately after defecation without contact with the floor) on day 40 and stored frozen at -80°C.

For DNA extraction, the commercial kit (Qiagen Stool kit, Qiagen, Hilden, Germany) was used following the manufacturer instructions. Briefly, DNA was extracted from 200 mg of feces, purified and stored at -30°C for posterior analysis. The concentration of DNA extracts was analyzed by NanoDrop 3300 with Hoechst 33258 dye in conjunction with the micro-volume capability of the Thermo Fisher NanoDrop™ 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) Thereafter, the qPCR analyzes were performed with AriaMx Real-Time PCR (Agilent Technologies Inc.) instrument using the primer sequences for certain bacteria (Malinen et al., 2003; Matsuki et al., 2004; Rintillä et al., 2004; Song, Liu and Finegold, 2004).

The sequences of primers used are shown in table 12 and the target species of primers used in quantitative PCR are shown in table 13.

TABLE 12 – SEQUENCES OF PRIMERS USED IN QUANTITATIVE PCR AND THEIR ANNEALING TEMPERATURES.

Group	Sequence of Oligonucleotides	Primers pair	AT* (°C)	Reference
<i>Bacteroides</i> – <i>Prevotella</i> – <i>Porphyromonas</i>	GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT CGGAYGTAAGGGCCGTGC	BPP1 BPP2	55	Rinttilä et al., 2004.
<i>Bifidobacterium</i> spp	TCGCGTCYGGTGTGAAAG CCACATCCAGCRTCCAC	g-BIFID-F g-BIFID-R	58	Rinttilä et al., 2004.
<i>Clostridium difficile</i>	TTGAGCGATTACTTCGGTAAAGA CCATCCTGTACTGGCTCACCT	Cdiff-16S-1f Cdiff-16S-1r	58	
<i>Clostridium perfringens</i>	TGACACAGGGGAATCACAAA CGCTATCAACGGCAGTAACA	Cpa-1-f Cpa-1-r	55	
Cluster I (<i>Clostridium</i> group)	TACCHRAGGAGGAAGCCAC GTTCTTCTAATCTCTACGCAT	CI-F1 CI-R2	63	Song, Liu and Finegold, 2004.
Cluster IV (<i>Clostridium leptum</i> group)	GCACAAGCAGTGGAGT CTTCCTCCGTTTGTCAA	sg-Clept-F sg-Clept-R	60	Matsuki et al., 2004.
Cluster XIVa (<i>Coccoides</i> group)	AAATGACGGTACCTGACTAA CTTTGAGTTTCATTCTTGGAA	g-Ccoc-F g-Ccoc-R	60	Matsuki et al., 2004.
Enterobacteria	GTBTCDCCRCGCAGRC TGCGYCTGGTRATCTA	EntqPCR 3417f EntqPCR3852r	55	
<i>Enterococcus</i> spp	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT ACTCGTTGTACTTCCCATTGT	Ent 1 Ent 2	60	Rinttilä et al., 2004.
<i>Escherichia coli</i> – <i>Hafnia</i> – <i>Shigella</i>	GTTAATACCTTTGCTCATTGA ACCAGGGTATCTAATCCTGTT	Entero-F Entero-R	55	Malinen et al., 2003.
<i>Lactobacillus</i> spp	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	Lac 1 Lac 2	58	Rinttilä et al., 2004.
<i>Salmonella</i> spp	GAAGCAGCGCCTGTAAAATC TGGCTGTGTGCAAAATATC	QVR133 QVR134	60	
Segmented filamentous bacteria	GGAGTCTGCGGCACATTA CACCTTAGACTGCTGCCTC	SFB779f SFB1008r	56	

*AT = Annealing temperature.

TABLE 13 – TARGET SPECIES OF PRIMERS PAIRS USED IN QUANTITATIVE PCR.

Group	Target species
<i>Bacteroides</i> – <i>Prevotella</i> – <i>Porphyromonas</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>B. stercoris</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>B. eggerthii</i> , <i>B. acidofaciens</i> , <i>B. caccae</i> , <i>B. ovatus</i> , <i>B. uniformis</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>B. distasonis</i> , <i>B. merdae</i> , <i>B. forsythus</i> , <i>Prevotella tannerae</i> , <i>P. bryantii</i> , <i>P. ruminicola</i> , <i>P. heparinolytica</i> , <i>P. zooglyphiformans</i> , <i>P. brevis</i> , <i>P. loeschii</i> , <i>P. buccae</i> , <i>P. oralis</i> , <i>P. enoea</i> , <i>P. melaninogenica</i> , <i>P. veroralis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. albensis</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>P. corporis</i> , <i>P. disiens</i> , <i>P. bivia</i> , <i>P. pallens</i> , <i>P. denticola</i> , <i>Porphyromonas canoris</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. asaccharolytica</i> , <i>P. levii</i> , <i>P. cangingivalis</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>P. macacae</i> , <i>P. circumdentaria</i> , <i>P. Catoniae</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>B. angulatum</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. asteroides</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. boum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. choerinum</i> , <i>B. coryneforme</i> , <i>B. cuniculi</i> , <i>B. denticolens</i> , <i>B. dentium</i> , <i>B. gallicum</i> , <i>B. gallinarum</i> , <i>B. indicum</i> , <i>B. inopinatum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. magnum</i> , <i>B. merycicum</i> , <i>B. minimum</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i> , <i>B. pseudolongum</i> , <i>B. pullorum</i> , <i>B. ruminantium</i> , <i>B. saeculare</i> , <i>B. subtile</i> , <i>B. thermacidophilum</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. tsurumense</i> .
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
Cluster I (<i>Clostridium</i> group)	<i>Clostridium favosporum</i> , <i>C. corinoformum</i> , <i>C. puniceum</i> , <i>C. caliptrosporum</i> , <i>C. beijerinckii</i> , <i>C. acetobutylicum</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. kainantoi</i> , <i>C. botulinum non-proteolytic type B</i> , type E and type F, <i>C. aurantibutyricum</i> , <i>C. charatabidum</i> , <i>C. longisporum</i> , <i>C. parapatrifricum</i> , <i>C. carnis</i> , <i>C. quini</i> , <i>C. celatum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. baratii</i> , <i>C. absonum</i> , <i>C. cellulovorans</i> , <i>C. fallax</i> , <i>C. algidicarnis</i> , <i>C. cadaveris</i> , <i>C. intestinalis</i> , <i>C. collagenovorans</i> , <i>C. sardiniense</i> , <i>C. homopropionicum</i> , <i>C. thermopalmarium</i> , <i>C. thermobutyricum</i> , <i>C. botulinum tipo C</i> , tipo D e tipo G, <i>C. botulinum proteolítico tipo A e tipo F</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. estertheticum</i> , <i>C. subterminale</i> , <i>C. oceanicum</i> , <i>C. putrificum</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>C. tetanomorphum</i> , <i>C. malenominatum</i> , <i>C. cochlearium</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. pasteurianum</i> , <i>C. magnum</i> , <i>C. scatologenes</i> , <i>C. kluyveri</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> , <i>C. iijungdahlii</i> , <i>Sarcina ventriculi</i>
Cluster IV (<i>Clostridium leptum</i> group)	<i>Clostridium cellulosi</i> , <i>C. leptum</i> , <i>C. orbiscindens</i> , <i>C. sporosphaeroides</i> , <i>C. viride</i> , <i>Eubacterium desmolans</i> , <i>E. siraeum</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>R. bromii</i> , <i>R. callidus</i> , <i>R. Flavofaciens</i>
Cluster XIVa (<i>Coccoides</i> group)	<i>Clostridium clostridioforme</i> , <i>C. coccoides</i> , <i>C. nexile</i> , <i>C. oroticum</i> , <i>C. sphenoides</i> , <i>C. baratii</i> , <i>Ruminococcus gnavus</i> , <i>R. lactaris</i> , <i>R. productus</i> .

TABLE 13 – TARGET SPECIES OF PRIMERS PAIRS USED IN QUANTITATIVE PCR (CONTINUATION).

Group	Target species
Enterobacteria	<i>Alishewanella</i> , <i>Alterococcus</i> , <i>Aquamonas</i> , <i>Aranicola</i> , <i>Arsenophonus</i> , <i>Azotivirga</i> , <i>Blochmannia</i> , <i>Brenneria</i> , <i>Buchnera</i> , <i>Budvicia</i> , <i>Buttiauxella</i> , <i>Cedecea</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Dickeya</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Ewingella</i> , <i>Grimontella</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Leclercia</i> , <i>Leminorella</i> , <i>Moellerella</i> , <i>Morganella</i> , <i>Obesumbacterium</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Pectobacterium</i> , <i>Phlomobacter</i> , <i>Photorhabdus</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Pragia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Raoultella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Samsonia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Sodalis</i> , <i>Tatumella</i> , <i>Trabulsiiella</i> , <i>Wigglesworthia</i> , <i>Xenorhabdus</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Yokenella</i> .
<i>Enterococcus</i> spp	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus avium</i> <i>Enterococcus galinarum</i> , <i>Enterococcus raffinosus</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Enterococcus durans</i> .
<i>Escherichia coli</i> – <i>Hafnia</i> – <i>Shigella</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Shigella</i> spp.
<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Lactobacillus acetotolerans</i> , <i>L. acidifarinae</i> , <i>L. acidiphilus</i> , <i>L. agilis</i> , <i>L. algidus</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. amylolyticus</i> , <i>L. amylophilus</i> , <i>L. amylophilus</i> , <i>L. amylophilus</i> , <i>L. animalis</i> , <i>L. antri</i> , <i>L. apodemi</i> , <i>L. avarius</i> , <i>L. bifementans</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. camelliae</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. cateniformis</i> , <i>L. ceti</i> , <i>L. coleohominis</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. composti</i> , <i>L. concavus</i> , <i>L. coryniformis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. crustorum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. dextrinicus</i> , <i>L. diolivorans</i> , <i>L. equi</i> , <i>L. equigenensis</i> , <i>L. farraginis</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. fornicalis</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. frumenti</i> , <i>L. fuchuensis</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. gasserii</i> , <i>L. gastricus</i> , <i>L. ghanensis</i> , <i>L. graminis</i> , <i>L. hammesii</i> , <i>L. hamsteri</i> , <i>L. harbinensis</i> , <i>L. hayakitensis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. homohiochii</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. ingluviei</i> , <i>L. intestinalis</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. kalixensis</i> , <i>L. kefirifaciens</i> , <i>L. kefirii</i> , <i>L. kimchii</i> , <i>L. kitasatonis</i> , <i>L. kunkeei</i> , <i>L. leichmannii</i> , <i>L. lindneri</i> , <i>L. malefermentans</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. manihotivorans</i> , <i>L. mindensis</i> , <i>L. mucosae</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. nagelii</i> , <i>L. namurensis</i> , <i>L. nantensis</i> , <i>L. oligofermentans</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. pantheris</i> , <i>L. parabrevis</i> , <i>L. parabrueckii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. paracollinoides</i> , <i>L. parafarraginis</i> , <i>L. parakefiri</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. perolens</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. protectus</i> , <i>L. psittaci</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. rimae</i> , <i>L. rogosa</i> , <i>L. rossiae</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. saerimneri</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. satsumensis</i> , <i>L. secaliphilus</i> , <i>L. sharpeae</i> , <i>L. siliginis</i> , <i>L. spicheri</i> , <i>L. suebicus</i> , <i>L. thailandensis</i> , <i>L. ultunensis</i> , <i>L. vaccinosferus</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. versmoldensis</i> , <i>L. vini</i> , <i>L. vitulinus</i> , <i>L. zeae</i> , <i>L. zymae</i> .
<i>Salmonella</i> spp	<i>Salmonella bongori</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. subterranea</i> .
Segmented filamentous bacteria	Segmented filamentous bacteria.

7.4.3 Determination of microbial metabolites in fecal samples

For the analysis of short chain fatty acids (SCFA), 300mg of feces were weighted and diluted in one milliliter of hexanoic acid (0.5 mmol/L of hexanoic acid, 10g/L of oxalic acid), homogenized for one hour and centrifuged at 14.000G for 10minutes (Thermo Scientific – Heraeus Fresco 21 Centrifuge). Hexanoic acid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) was used as the internal standard (0.5mmol/L). The sample was injected (one microliter) into a gas chromatograph (Agilent Technologies, Hewlett-Packard 6890N model, and 7683 Series Injector, Santa Clara, USA). The initial temperatures in the column injector and on flame ionization detector were 150°C and 250°C, respectively. The hydrogen gas produced by a gas generator (9150 – Parker ChromGas) was the carrier gas with a flow rate of 27 mL/minute.

7.4.4 Digestibility assay and fecal characteristics

35 days after the dogs started receiving the diets, total feces collection was accomplished for 5 days to digestibility assay, as recommended by the Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 2003). Feces were collected at least twice a day, weighed and stored in a freezer at -20 °C. At the end of each period, the feces were homogenized and dried in a forced-ventilation oven at 55°C for 48 hours until constant weight. Dried feces and diets were ground to 1-mm particles and analyzed to determine dry matter (DM) at 105°C for 12 hours, crude protein (CP), ether extract after acid hydrolysis (EEAH, crude fat – CF), and ash contents, according to the Association of the Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). The gross energy (GE) was determined in a bomb calorimeter (Parr Instrument Co., model 1261, Moline, IL, USA). Total fecal DM content was calculated according to the equation: $DM = (DM_{55} \times DM_{105}) / 100$. A portion of fresh feces was freeze-dried to determine sialic acid content according to Jourdian et al. (1971).

Total DM content, fecal output (g feces/g DM intake/5 days) fecal score, ammonia content, and pH were evaluated. Fecal score was always evaluated by the same person using a fixed scale: 1 = watery feces; 2 = soft and unshaped stools; 3 = soft, shaped, and moist stools; 4 = well-shaped and uniform stools; 5 = well-shaped, hard and dry stools, as proposed by Carciofi et al. (2009). Fecal pH and ammonia content were determined in fresh feces collected no more than 15 minutes after defecation. Fecal pH was determined in 2.0 g fresh feces diluted in 20 mL distilled

water using a digital pHmeter (331, Politeste Instrumentos de Teste LTDA, São Paulo, SP, Brazil). The fecal ammonia content was determined according to Brito et al. (2010). Three drops of octaethyl alcohol (1-octanol) and 2 g of magnesium oxide were added. The mixture was distilled in macro-Kjedahl apparatus and recovered in a beaker containing 50 mL of boric acid. Finally, ammonia was titrated using 0.1 N standard sulfuric acid. Ammonia concentration was calculated as: ammonia nitrogen (g/kg) = $N \times \text{correction factor} \times 17 \times [(\text{volume of acid in the sample} - \text{volume of acid in blank sample}) / \text{sample weight in grams}]$. The fecal ammonia concentration was corrected for fecal DM.

Apparent digestibility and ME coefficients were estimated according to AAFCO (2003) using the following equations:

$$\text{CTTAD} = (\text{g of nutrient intake} - \text{g of nutrient excretion}) / \text{g of nutrient intake}$$

$$\text{ME (kcal g}^{-1}\text{)} = \{ \text{kcal g}^{-1}\text{GE intake} - \text{kcal g}^{-1}\text{GE fecal excretion} - [(\text{gCP intake} - \text{g CP fecal excretion}) \times 1.25 \text{ kcal g}^{-1}] \} / \text{g of feed intake.}$$

7.4.5 Complete blood count and biochemical profiles

Prior to blood collection, the dogs were fasted for 12 h and water was offered *ad libitum*. Two blood samples (1.5mL each) were collected from the jugular vein on day 1 and day 40 of the experiment. The samples were stored in vials with EDTA for complete blood counts (CBC) (Cell-Dyn Ruby System, Abbott Laboratories, Illinois, USA). For serum biochemistry profiles (ALT – alanine aminotransferase, ALP – alkaline phosphatase, creatinine and urea), the samples were stored in vials without EDTA and the serum analyzes were performed using a biochemical automatic analyzer (Wiener Airone – Wiener Lab Group, Rosario, Argentina).

7.4.6 Statistical analysis

Data were submitted to Shapiro-Wilk normality test and to Bartlett's homoscedasticity test. The Mann-Whitney-Wilcoxon was used to test the percentages of values and the variables are presented using mean for SCFA, CBC, biochemical profiles and median with interquartile ranges (IQR) for quantitative PCR.

Digestibility means were compared by Student's t-test and fecal characteristics means were compared using the Mann-Whitney-Wilcoxon test.

Statistical analysis was performed using SPSS Statistics (version 22 for Windows) with 5% probability for differences and 10% for tendencies.

7.5 RESULTS

7.5.1 Microbiota profile and determination of microbial metabolites in fecal samples

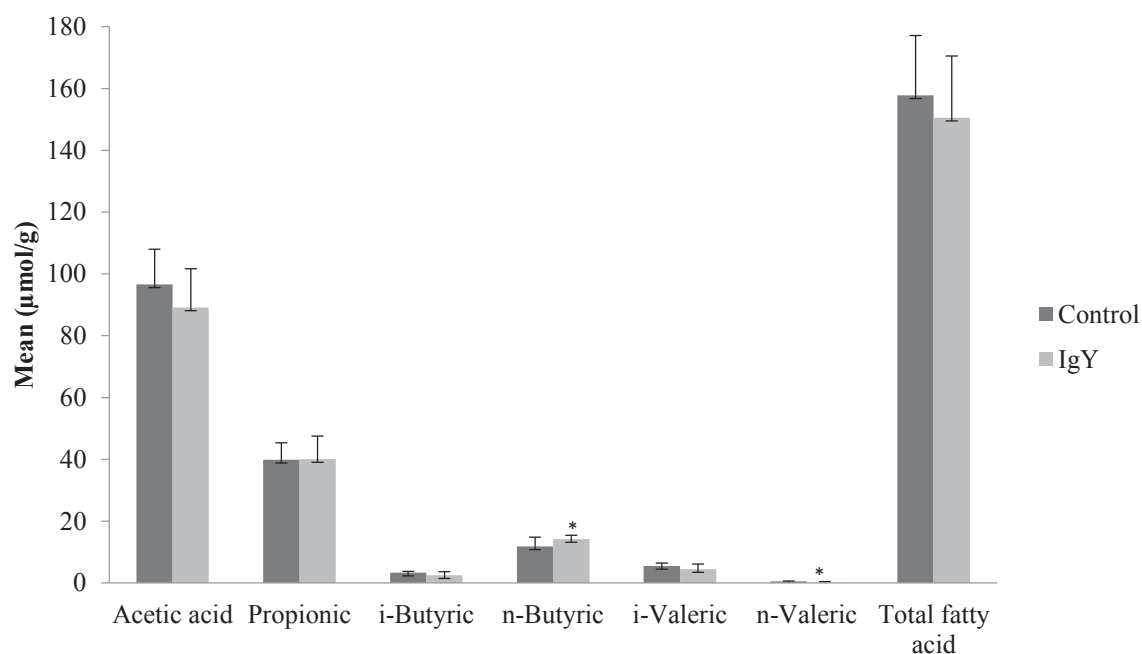
The microorganisms assessed in feces did not differ between the treatments ($P>0.05$), except for a tendency ($P=0.07$) towards an increase in the copy number of clostridial cluster XIVa (*C. coccoides* group) in the IgY group when compared with the control group (Table 14).

TABLE 14 – BACTERIAL PREVALENCE PRESENTED AS PERCENTAGES (%) AND COUNTS (LOG₁₀ COPY/G) PRESENTED AS MEDIAN WITH IQR IN FECAL SAMPLES FROM BEAGLE DOGS RECEIVING PLACEBO AND IgY AS ANALYZED BY qPCR.

Bacteria	Control Group, n=8		IgY Group, n=8		Comparison of groups	
	%	Median (IQR)	%	Median (IQR)	P ¹	P ²
<i>Bacteroides – Prevotella – Porphyromonas</i>	100.0	9.65 (9.41 – 9.97)	100.0	9.60 (9.22 – 10.17)	----	0.60
<i>Bifidobacterium</i> spp	12.5	0 (0 – 7.61)	0	0	1.00	0.31
<i>Clostridium difficile</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	87.5	5.80 (0 – 7.59)	87.5	6.06 (0 – 7.52)	1.00	0.39
Cluster I (<i>Clostridium</i> group)	100.0	5.62 (4.47 – 6.99)	100.0	5.83 (4.13 – 7.09)	----	0.67
Cluster IV (<i>Clostridium leptum</i> group)	100.0	8.77 (8.45 – 9.14)	100.0	8.85 (8.46 – 9.28)	----	0.75
Cluster XIVa (<i>Coccoides</i> group)	100.0	8.35 (7.91 – 8.59)	100.0	8.70 (7.94 – 9.19)	----	0.07
Enterobacteria	100.0	8.14 (8.05 – 8.28)	100.0	8.10 (7.96 – 8.25)	----	0.60
<i>Enterococcus</i> spp	100.0	7.29 (6.32 – 8.25)	100.0	7.79 (0 – 8.70)	----	0.24
<i>Escherichia coli – Hafnia – Shigella</i>	100.0	6.56 (3.92 – 7.27)	100.0	5.92 (4.23 – 7.12)	----	0.52
<i>Lactobacillus</i> spp	100.0	8.48 (8.04 – 11.95)	100.0	8.82 (0 – 9.97)	----	0.83
<i>Salmonella</i> spp	0	0	0	0	0	0
Segmented filamentous bacteria	100.0	9.42 (8.78 – 10.64)	100.0	10.29 (8.56 – 11.09)	----	0.14

IQR = interquartile range; P1 = Fisher exact test was used to test the percentages of positive values; P2 = The Mann-Whitney-Wilcoxon test was used to test counts of bacteria.

The average mean of *n*-butyric acid concentration was higher and *n*-valeric acid concentration was lower ($P<0.05$) in dogs that received the IgY in the diet. The other microbial metabolites, such as acetic, propionic, *i*-butyric, *i*-valeric and total fatty acids evaluated in fecal samples did not differ between the two treatments ($p>0.05$, Figure 26).



* $P<0.05$ by Mann-Whitney-Wilcoxon test.

FIGURE 26 – MEAN CONCENTRATION AND STANDARD DEVIATION OF SCFA ($\mu\text{MOL/G}$) PRESENT IN FECAL SAMPLES FROM BEAGLE DOGS RECEIVING PLACEBO (CONTROL GROUP) AND IGY (TREATMENT GROUP) FOR A PERIOD OF 40 DAYS AS ANALYZED BY GAS CHROMATOGRAPHY.

7.5.2 Apparent fecal nutrient digestibility, fecal characteristics, sialic acid concentration, pH and ammonia nitrogen

No significant differences were found in apparent fecal nutrient digestibility when DM, CP, CF, GE, metabolized energy and feed intake DM were analyzed ($P>0.05$, Table 3). The colonic pH and the concentration of sialic acid in the IgY group was lower in comparison with the control group ($P<0.05$, Table 15). Fecal score and ammonia nitrogen did not change between the two groups ($P>0.05$, Table 16).

TABLE 15 – APPARENT FECAL DIGESTIBILITY (CDA, %), METABOLIZABLE ENERGY (ME, KCAL/KG) AND FEED INTAKE IN DOGS FED WITH IgY AND WITHOUT IgY (CONTROL GROUP) 40 DAYS AFTER RECEIVING THE DIETS.

	Control Group	IgY Group	SEM
Dry matter	85.53	85.40	0.49
Crude protein	89.23	88.08	0.37
Crude fat	85.53	85.40	0.49
Gross energy	88.62	88.56	0.30
Metabolizable energy	3913.20	3903.80	16.57
Feed intake DM (g/5 days)	974.16	950.40	8.11

SEM: Standard error of the mean. a,b Means followed by different letters in treatments differ by Mann-Whitney-Wilcoxon test ($P < 0.05$).

TABLE 16 – FECAL SCORE, SIALIC ACID, PH AND NH_3 OF THE DOGS FED THE DIETS WITH IgY AND WITHOUT IgY (CONTROL GROUP) 40 DAYS AFTER RECEIVING THE DIETS.

	Control Group	IgY Group	SEM
Fecal score	3.62	3.70	0.10
Sialic acid (mg/kg/day)	0.89 ^b	0.83 ^a	0.04
pH	7.25 ^b	6.96 ^a	0.07
NH_3^*	0.13	0.14	0.01

SEM: Standard error of the mean. * NH_3 : ammonia nitrogen (g/kg); ^{a,b}Means followed by different letters in treatments differ by Mann-Whitney-Wilcoxon test ($P < 0.05$).

7.5.3 Complete blood count and biochemical profiles

CBC and serum biochemistry profiles (ALT, ALP, creatinine and urea) did not differ between the two treatments ($P > 0.05$, Table 17 and Table 18, respectively).

TABLE 17 – ALT, ALP, CREATININE AND UREA ANALYZED ON DAYS 1 AND 40 IN ANIMALS WITHOUT IGY (CONTROL GROUP) AND WITH IgY.

	ALT (UI/L)	ALP (UI/L)	Creatinine (mg/dl)	Urea (mg/dl)
Day 1				
Control	46	103.00	0.81	38.00
IgY	48	99.62	0.83	36.87
P-value	0.89	0.69	0.52	0.97
SEM	2.96	3.96	0.02	1.48
Day 40				
Control	34	82.25	0.84	33.37
IgY	37	91.00	0.82	39.50
P-value	0.81	0.44	0.59	0.27
SEM	2.26	5.29	0.02	1.82

ALT: alanine aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; SEM: Standard error of the mean; Means with Mann-Whitney-Wilcoxon test ($P < 0.05$).

TABLE 18 – COMPLETE BLOOD COUNT (CBC) ON DAYS 1 AND 40 IN ANIMALS WITHOUT IGY (CONTROL GROUP) AND WITH IGY.

	RBC (millions/ μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	LK (mm ³)	TN (mm ³)	RN (mm ³)	SN (mm ³)	EC (mm ³)	LYMP (mm ³)	Platelet s
Day 1										
Control	6.67	14.40	43.75	16,170	10560	917.75	9,641	336.63	5278.90	424,25
IgY	6.46	14.20	43.00	16,270	11151	627.00	10,524	239.25	4872.30	405,87
P-value	0.36	0.33	0.68	0.95	0.64	0.50	0.44	0.31	0.53	0.57
SEM	0.08	0.12	0.55	1051.30	924.27	129.23	875.26	48.72	324.55	14594
Day 40										
Control	6.23	13.97	42.12	17,150	11276	1228.9	10047	590.13	5236.10	404,21
IgY	6.35	19.90	41.50	17,049	11372	1010.9	10512	307.50	5727.10	415,00
P-value	0.70	0.89	1.000	0.89	0.95	0.64	0.79	0.18	0.32	0.23
SEM	0.10	0.18	0.80	519.36	395.17	177.87	414.36	97.53	317.47	27038

RBC: Red blood cell (Erythrocytes); Hb: Hemoglobin; Ht: Hematocrit; LK: Leukocytes; TN: Total Neutrophil; RN: Rods Neutrophil; SN: Segmented Neutrophil; EC: Eosinophil count; LYMP: Lymphocytes. SEM: Standard error of the mean; Means with Mann-Whitney-Wilcoxon test ($P < 0.05$).

7.6 DISCUSSION

Our study evaluated the inclusion of IgY in the diet with the objective to investigate systemic and gastrointestinal effects in dogs. The use of IgY offers some advantages compared with other mammalian antibodies, such as reduction in animal use, since chickens produce larger amounts of antibodies than laboratory animals, and provide the elimination of painful blood collections in animals (Dias da Silva & Tambourgi, 2010; Rahman et al., 2013).

It has been shown that GIT of animals contains a high diversity of microorganisms that help maintain intestinal and overall health. The manipulation of intestinal microorganisms and their metabolites to improve health has been of interest for decades (Garcia-Mazcorro et al., 2012). SCFA, resulting from carbohydrate and amino acid fermentation, are the major end products of bacterial metabolism in the intestine, including acetate, propionate and butyrate while formate, valerate, caproate and isobutyrate, 2-methyl-butyrate and isovalerate, which are formed during the catabolism of branched-chain amino acids (valine, leucine, isoleucine) are produced in lesser amounts (Macfarlane & Macfarlane, 2003). The inclusion of IgY in the diet led to increased levels of *n*-butyric in comparison to control group. According to Wong et al. (2006), butyrate, which is an important energy source for colonocytes, helps in the absorption of ions and act on the intestinal peristalsis preventing colitis, while acetate beneficially modulates intestinal permeability (Fukuda et al., 2012; Panasevich et al., 2014). A lower level of *n*-valeric found in IgY group feces is also beneficial for the GIT

tract of dogs. During the colonic fermentation of endogenous and undigested amino acids, several putrefactive compounds, such as n-valeric, which are responsible for the malodor of the feces, are produced (Hussein et al., 1999). Fecal ammonia, an indicator for microbial protein degradation did not differ between the groups. A lower fecal pH was seen in IgY group. This reduction in pH may exert a beneficial effect on the intestine because of the production of putrefactive compounds, which are harmful to intestinal health and cause bad odors in the feces of dogs (due to the presence of ammonia, phenol and indole) (Yamka et al., 2006). In addition, the sialic acid concentration of IgY group also decreased. The measurement of sialic acid in fecal samples is an important indicator of gastrointestinal health; as sialic acid usually increases in conditions involving cell senescence, bacterial infections and osmotic fragility, in addition to being an indicator of endogenous losses in the GIT (Rutherford et al., 2002).

It is important to study the microbiota of healthy animals to understand the profile of GIT microbiota in sick animals. Jia et al. (2010) used eight healthy dogs between 4 and 13 years of age and FISH was performed on fecal samples. The most abundant phylum present was *Firmicutes* and included *Clostridium*, *Eubacterium*, and the *Lactobacillus–Enterococcus* group. Other studies have also confirmed that *Firmicutes*, *Bacteroides* and *Fusobacteria* have been reported to be the predominant bacterial phyla in the colon and feces of dogs and cats (Kil & Swanson, 2011; Suchodolski, 2011; Swanson et al., 2011; Deng & Swanson, 2014). We found that the count of bacterial *Clostridium* Cluster XIVa (*Coccoides* group) was greater in animals which received IgY. Clostridial cluster XIVa together with cluster IV produce SCFA, especially butyrate, which is a preferred energy source of colonocytes and plays an important role in GIT health. The butyrate production stimulates cell proliferation, promotes apoptosis, and prevents colon cancer (Hooda et al., 2012; Wong et al., 2006). These groups of bacteria in GIT are important for the animal, because *Clostridium* clusters XIVa and IV make up approximately 60% of all Clostridiales, and encompass many important SCFA producing bacteria, such as *Ruminococcus* spp., *Faecalibacterium* spp., *Dorea* spp., and *Turicibacter* spp. In humans and dogs with acute or chronic enteropathies, counts of these bacteria are consistently depleted, emphasizing the importance of these bacterial groups in intestinal health (Suchodolski, 2011).

By knowing the microorganisms present in the gut of healthy animals, it is possible to diagnose when the animals are in dysbiosis. With the aim to prevent enteric diseases, IgY can be fundamental to maintain the GIT health. Among other functions, such as antimicrobial and antioxidant activity, IgY contributes to the GIT health of animals because it has antiadhesive properties. *In vitro* studies have confirmed the ability of specific IgY in egg yolk to reduce bacterial adherence to epithelial cells (Deignan, et al., 2001). As the animals in our study were healthy, CBC, biochemical profiles, digestibility and fecal characteristics did not change between the treatments since the animals received the same diet and the only thing that was different was the addition of IgY. Previous studies showed that egg yolk is normally included in the diet and there is no risks for side effects such as toxicity and blood levels alterations (Karlsson et al., 2004).

The use of IgY with specific antibodies against bacterial or viral antigens may be an important alternative to fight against enteric infections. In a clinical trial against parvovirus in dogs, Nguyen et al. (2006) revealed that the animals which received IgY had better fecal score in comparison with the animals in control group, affirming that IgY was effective in helping the recovery in animals in status of disease. Several studies in another species, such piglets, mice and calves, are proving the efficacy of IgY against enteric infections (Diraviyam et al., 2014). In a recent study, Da Rosa et al. (2015) showed that the IgY present in egg yolk is effective against *Escherichia coli* (ETEC) F4 and F18 in newly weaned piglets. Animals that received IgY did not present diarrhea as was seen in dry porcine plasma and control group. Acting as a functional food, IgY may provide a useful means of preventing gastrointestinal infection by keeping bacteria unbound in the gut lumen where they are more susceptible to the body's clearing mechanisms (Deignan et al., 2001). The passive protective effect of IgY against specific pathogens has been studied in veterinary medicine and offers a prophylactic and therapeutic approach for controlling GIT diseases (Karlsson et al., 2004).

7.7 CONCLUSION

In conclusion, when IgY was used in the diet of healthy dogs, the effects in microbiota profile, microbial metabolites, decreased colonic pH and sialic acid production were moderate. On the other hand, further *in vivo* studies are necessary to

clarify the benefits in GIT of dogs and to assess the effects of IgY, especially in animals with enteropathies. Nevertheless, the inclusion of IgY in diet for dogs seems to be an interesting way to maintain GIT health.

7.8 REFERENCES

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. Dog and Cat Nutrient Profiles. Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporated. AAFCO, Oxford, IN, USA, 2003.

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Washington, D.C., USA. 1995.

BRITO, C.B.M.; FÉLIX, A.P.; JESUS, R.M., FRANÇA, M.I.; OLIVEIRA, S.G.; KRABBE, E.L.; MAIORKA, A. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels: and the inclusion of a mould inhibitor. **Animal Feed Science and Technology**, v.159, p.150–155, 2010.

CARCIOFI, A.C.; OLIVEIRA, L.; VALÉRIO, A.; BORGES, L.L.; CARVALHO, F.; BRUNETTO, M.A.; VASCONCELLOS, R.S. Comparison of micronized whole soya to common protein sources in dry dog and cat diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.151, p.251–260, 2009.

DA ROSA, D.P.; VIEIRA, M.M.; KESSLER, A.M.; MOURA, T.M.; FRAZZON, A.P.G.; McMANUS, C.M.; MARX, F.R.; MELCHIOR, R.; RIBEIRO, A.L. Efficacy of hiperimmunized hen egg yolks in the control of diarrhea in newly weaned piglets. **Food and Agricultural Immunology**, 2015.

DEIGNAN, T.; ALWAN, A.; MALONE, L.; KELLY, J.; O'FARRELLY, C. Hen egg yolk prevents bacterial adherence: a novel function for a familiar food. **Journal of Food Science – Food Microbiology and Safety**, v. 66, n.1, p.158-161, 2001.

DENG, P.; SWANSON, K.S. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. **British Journal of Nutrition**, v.113, p.S6-S17, 2014.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.135, p.173-180, 2010.

DIRAVIYAM, T.; ZAO, B.; WANG, Y.; SCHADE, R.; MICHAEL, A.; ZHANG, X. Effect of Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) against Diarrhea in Domesticated Animals: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PloS ONE**, v.9, n.5, e97716, p.1-14. 2014.

FUKUDA, S.; TOH, H.; TAYLOR, T.D.; OHNO, H.; HATTORI, M. Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. **Gut Microbes**, v.3, p.449-454, 2012.

GARCIA-MAZCORRO, J.F.; DOWD, S.E.; POULSEN, J.; STEINER, J.M.; SUCHODOLSKI, J.S. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. **Microbiology Open**, v.1, n.3, p.340-347, 2012.

GRASP | EW NUTRITION. **Globigen® Intestinal Care**. Visbek, Germany. 2013.

HATTA, H.; TSUDA, K.; AKACHI, S.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.57, p.450-454, 1993.

HOODA, S.; MINAMOTO, Y.; SUCHODOLSKI, J.S.; SWANSON, K.S. Current state of knowledge: the canine gastrointestinal microbiome. **Animal Health Research Reviews**, v.13, n.1, p.78-88, 2012.

HUSSEIN, H.S., FLICKINGER, E.A., FAHEY JR, G.C. Petfood applications of inulin and oligofructose. **The Journal of Nutrition – American Society for Nutritional Sciences**, p.1454S-1456S, 1999.

JIA, J.; FRANTZ, N.; KHOO, C.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A.; McCARTNEY, A.L. Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhea. **FEMS – Microbiology Ecology**, v.71, p.304-312, 2010.

JOURDIAN, G.W.; DEAN, L., ROSEMAN, S. The sialic acids – A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. **The Journal of Biological Chemistry**, v.246, n.2, p. 430–435, 1971.

KARLSSON, M., KOLLBERG, H., LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v.50, p.341-348, 2004.

KIL, D. L.; SWANSON, K. S. Companion animals symposium: Role of microbes in canine and feline health. **Journal of Animal Science**, v.89, p.1498-1505, 2011.

KLEMPERER, F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v.31, p.356-382, 1893.

LEE, E.N.; SUNWOO, H.H.; MENNINEN, K.; SIM, J.S. In vitro studies of chicken egg yolk (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**, v.81, p.632-641, 2002.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T. Regulation of short-chain fatty acids. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.62, p.67-72, 2003.

MALINEN, E.; KASSINEN, A.; RINTTILÄ, T.; PALVA, A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected fecal bacteria. **Microbiology**, v.149, p.269-277, 2003.

MATSUKI, T.; WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; TAKADA, T.; TANAKA, R. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.7220-7228, 2004.

NGUYEN, S.V.; UMEDA, K.; YOKOYAMA, H.; TOHYA, Y.; KODAMA, Y. Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, p.62-64, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient Requirements of Dogs and Cats. National Academy Press. Washington, 2006, 426p.

NILSSON, E.; LARSSON, A. Stability of chicken IgY antibodies freeze-dried in the presence of lactose, sucrose and threulose. **The Journal of Poultry Science**, v.44, p.58-62, 2007.

PANASEVICH, M.R.; KERR, K.R.; DILGER, R.N.; FAHEY JR, G.C.; GUÉRINDEREMAUX, L.; LYNCH, G.L.; WILS, D.; SUCHODOLSKI, J.S.; STEINER, J.M.; DOWD, S.E.; SWANSON, K.S. Modulation of the faecal microbiome of healthy adult dogs by inclusion of potato fibre in the diet. **British Journal of Nutrition**, p.1-9, 2014.

SUCHODOLSKI, J.S. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v.41, p.261-272, 2011.

SUGITA-KONISHI, Y., SHIBATA, K., YUN, S.S., HARA-KUDO, Y., YAMAGUCHI, K., KUMAGAI, S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.60, n.5, p.886-888, 1996.

SWANSON, K.S.; DOWD, S.E.; SUCHODOLSKI, J.S.; MIDDELBOS, I.S.; VESTER, B.M.; BARRY, K.A.; NELSON, K.E.; TORRALBA, M.; HENRISSAT, B.; COUTINHO,

P.M.; CANN, I.K.O.; WHITE, B.A.; FAHEY JR, G.C. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. **The ISME Journal – International Society for Microbial Ecology**, v.5, p.639-649, 2011.

RAHMAN, S.; NGUYEN, S.V.; ICATLO JR, F.C.; UMEDA, K.; KODAMA, Y. Oral passive IgY-based immunotherapeutics. A novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.9, n.5, p.1039–1048, 2013.

RINTTILÄ, T. KASSINEN, A.; MALINEN, E.; KROGIUS, L.; PALVA, A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in fecal samples by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.1166-1177, 2004.

RUTHERFURD, S.M.; CHUNG, T.K.; MOUGHAN, P.J. The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken. **British Poultry Science**, v.43, p.598–606, 2002.

SCHADE, R.; CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H.R. Chicken egg-yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Atla**, v.33, p.1-26, 2005.

SONG, Y.; LIU, C.; FINEGOLD, S.M. Real-Time PCR quantification of Clostridia in feces of autistic children. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.11, p.6459-6465, 2004.

YAMKA, R.M., HARMON, D.L., SCHOENHERR, W.D., KHOO, C., GROSS, K.L., DAVIDSON, S.J., JOSHI, D.K., In vivo measurement of flatulence and nutrient digestibility in dogs fed poultry by-product meal conventional soya meal, and low-oligosaccharide low-phytate soya meal. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, p.88-94, 2006.

WONG, J.M.W.; DE SOUZA, R.; KENDALL, C.W.C.; EMAM, A.; JENKINS, D.J.A. Colonic Health: Fermentation and short chain fatty acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.40, n.3, p.235-243, 2006.

ZHANG, W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, v.8, n.8, p.364-371, 2003.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de IgY como aditivo e nutracêutico na alimentação e tratamento de cães é uma nova alternativa para a indústria. Devido à sua especificidade contra antígenos específicos, a IgY é uma importante ferramenta para diminuir bactérias nocivas no trato gastrointestinal de cães. Os trabalhos publicados com a IgY em cães são de difícil comparação, já que envolvem outras espécies estudadas e não somente cães, além da pouca literatura na área.

Os dados levantados na revisão bibliográfica e os resultados obtidos no presente trabalho mostram a necessidade de futuros estudos aprofundados sobre o impacto da inclusão de IgY no trato gastrointestinal de cães. Portanto, mais estudos, utilizando animais doentes devem ser realizados para o melhor entendimento e potencial da IgY.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Básica – Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 336p.
- ABDALLA, S.L. Análise Computadorizada para avaliação dos índices de Placa Bacteriana e Cálculo Dentário em cães (*canis familiaris*). **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas)**. Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2008. 47p.
- ABDULACK-LOPES, F. Resposta imune ao parvovírus canino tipo2 (CPV 2) em hidrogel de quitosana administrado via sublingual. **Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo**, 2012.
- ALI, J.; PRAMOD, K.; ANSARI, S.H. Autoimmune responses in periodontal diseases. **Autoimmunity Reviews**. v.10, p.426-431, 2011.
- ALLAKER, R.P. Investigations into the micro-ecology of oral malodour in man and companion animals. **Journal of Breath Research**. v.4, p. 1-6, 2010.
- ALLAKER, R.P.; YOUNG, K.A.; LANGLOIS, T.; ROSAYRO, R.; HARDIE, J.M. Dental plaque flora of the dog with reference to fastidious and anaerobic bacteria associated with bites. **Journal of Veterinary Dentistry**. v.14, p.127-130, 1997.
- ALZARI, P.M., LASCOMBE, M.B., POLJAK, R.J. Three-Dimensional structure of antibodies. **Annual Review of Immunology**. v.6, p. 555-580, 1988.
- ANGELO, M.J.O., HAGIWARA, M.K., JULY, J.R., CARVALHO, R.P.S., BACCARO, M.R. Isolamento de parvovírus canino no Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo**, v.25, n.1, p.123-134, 1988.
- AMERICAN VETERINARY DENTAL SOCIETY - AVDS**. Disponível em: <http://avds-online.org/>. Acesso em: 11 novembro 2017.
- ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiology Immunology**. v.11, n.4, p.266-273, 1996.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS - AAFCO. **Official Publications 2004**. Association of American Feed Control Officials, 2004.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS**. Dog and Cat Nutrient Profiles. Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporated. AAFCO, Oxford, IN, USA, 2003.

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Washington, D.C., USA. 1995.

BAIA, J.D.; LEMOS, R.S.; MOREIRA, A.B.; GIOSO, M.A. Doença periodontal em cães: revisão de literatura. **Scientific Eletronic Archives**. v.10, n.5, p.150-162, 2017.

BARBOSA, B.C.; ALVES, F.S.; BEIER, S.L.; FALEIROS, R.R.; FREITAS, P.M. Fisiopatologia e terapia do cão com sepse: revisão. **Pubvet – Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.10, n.1, p.13-20, 2016.

BELETTINI, S.T.; ALBERTON, L.R.; SILVA, R.P.B.; STEL, R.F.; LOURENÇO, W.S.; PACHALY, J.R. Avaliação dos níveis séricos de lactato em cães submetidos a anestesia dissociativa. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia – Unipar, Umuarama**, v. 11, n.2, p. 87-95, 2008.

BOLLEN, L.S.; HAU, J. Immunoglobulin G in the developing oocytes of the domestic hen and immunospecific antibody response in serum and corresponding egg yolk. **In Vivo**. v.11, p.395-398, 1997.

BOLLER, E.M.; OTTO, C.M. **Septic shock**. In: SILVERSTEIN, D.C.; HOOPER, K. Small Animal Critical Care Medicine. St. Louis: Saunders, 2009. p. 454-458.

BRAGA, C.A.S.B.; RESENDE, C.M.F.; PESTANA, A.C.N.R.; CARMO, L.S.; COSTA, J.E.; SILVA, L.A.F.; ASSIS, L.N.L.; LIMA, L.A.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça Pastor Alemão. **Ciência Rural**. v.35, n.2, p.385-390, 2005.

BRITO, C.B.M.; FÉLIX, A.P.; JESUS, R.M.; FRANÇA, M.I.; OLIVEIRA, S.G.; KRABBE, E.L.; MAIORKA, A. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels: and the inclusion of a mould inhibitor. **Animal Feed Science and Technology**, v.159, p.150–155, 2010.

CARCIOFI, A.C.; OLIVEIRA, L.; VALÉRIO, A.; BORGES, L.L.; CARVALHO, F.; BRUNETTO, M.A.; VASCONCELLOS, R.S. Comparison of micronized whole soya to common protein sources in dry dog and cat diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.151, p.251–260, 2009.

CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJAKER, P.E.; LARSSON, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunologic Research**. v.21, n.1, p.1-6, 2000.

CARMAN, P.S.; POVEY, R.C. Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: haematology, serology and virus recovery. **Research in Veterinary Science**, v.38, p.134-140, 1985.

CARVALHO, C.; CABRAL, C. Papel da *Porphyromonas gingivalis* na doença periodontal. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**. v.48, n.1, p.167-171, 2007.

CHINCHKAR, S.R.; SUBRAMANIAN, B.M.; NAIDU, H.; THIAGARAJAN, D.; SRINIVASAN, V.A. Canine parvovirus isolates of India and the relevance of canine parvovirus type-2 vaccines. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v.4, n.1, p.34-41, 2014.

CONTI-PATARA, A. Evolução dos valores de saturação venosa central de oxigênio, lactato e déficit de base em cães com sepse grave e choque séptico submetidos à ressuscitação volêmica precoce. **Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2009. 102p.

CONWAY, P. L. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. In: Souffrant, W.B., Hagemeister, H. **Proceedings of the VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs**. EAAP Publication v.2, n.80, p.231-240. 1994.

COSTA SILVA, R.C.; CAMPOS, D.R.; OLIVEIRA, P.; LAGUNA, A.G.V.; MAGALHÃES, V.S.; CID, Y.P.; ALMEIDA, M.B.; SCOTT, F.B.; FERNANDES, J.I. Eficácia de um gel de quitosano mucoadesivo contendo doxiciclina associada ou não ao meloxicam como coadjuvante ao tratamento da gengivite em cães portadores da doença periodontal. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.38, n.2, p.40-44, 2016.

COX, E.R.; LEPINE, A.J.; CAREY, D.P. Influencias nutricionales en la salud dental del perro. **Revista de Medicina Veterinária**. v.83, p.265-272, 2003.

DA ROSA, D.P.; VIEIRA, M.M.; KESSLER, A.M.; MOURA, T.M.; FRAZZON, A.P.G.; McMANUS, C.M.; MARX, F.R.; MELCHIOR, R.; RIBEIRO, A.L. Efficacy of hiperimmunized hen egg yolks in the control of diarrhea in newly weaned piglets. **Food and Agricultural Immunology**, 2015.

DAVIES, E.L.; SMITH, J.S.; BIRKETT, C.R.; MANSER, J.M.; ANDERSON-DEAR, D.V.; YOUNG, J.R. Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes. **Journal of Immunological Methods**. v.186, n.1, p.125-135, 1995.

DE SIMOI, A. Systemic implications of periodontal disease. **Veterinary Focus**. v.22, n.3, p.25-30, 2012.

DEIGNAN, T.; ALWAN, A.; MALONE, L.; KELLY, J.; O'FARRELLY, C. Hen egg yolk prevents bacterial adherence: a novel function for a familiar food. **Journal of Food Science**. v.66, n.1, p.158-161, 2001.

DENG, P.; SWANSON, K.S. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. **British Journal of Nutrition**. v.113, p.S6-S17, 2014.

DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M.L.; RELMAN, D.A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **PLoS Biology**. v.6, n.11, p.2383-2400, 2008.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.135, p.173-180, 2010.

DINIZ, J.A. Produção e caracterização de IgY contra rLipL32 de *Leptospira interrogans*. **Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas**. 2012. 66p.

DIRAVIYAM, T.; ZHAO, B.; WANG, Y.; SCHADE, R.; MICHAEL, A.; ZHANG, X. Effect of chicken egg yolk antibodies (IgY) against diarrhea in domesticated animals: a systematic review and meta-analysis. **Plos One**. v.9, n.5, p.1-14, 2014.

EW NUTRITION. **Presentation Globigen® Oral Care**. Visbek, Germany. 2011.

EW NUTRITION. **Presentation Globigen® Intestinal Care**. Visbek, Germany. 2013.

FRANCO, R.P., MASSUFARO, C.R., MARTINELLI, J., GIROTTO, C.H., HIROTA, I.N., ZACHE, E., HATAKA, A. Valores de lactato sérico e sua correlação com parâmetros clínicos de cães saudáveis, mensurados durante atendimento ambulatorial veterinário. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.6, p.509-515, 2016.

FERREIRA, M.O. Diferentes abordagens terapêuticas em cães com parvovirose – caracterização do uso de antibióticos. **Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa**. 2011.

FUKUDA, S.; TOH, H.; TAYLOR, T.D.; OHNO, H.; HATTORI, M. Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. **Gut Microbes**, v.3, p.449-454, 2012.

GARCIA-MAZCORRO, J.F.; DOWD, S.E.; POULSEN, J.; STEINER, J.M.; SUCHODOLSKI, J.S. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. **Microbiology Open**. v.1, n.3, p.340-347, 2012.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K. **Manual de Hematologia Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Varela, 2005.

GASSMANN, M.; THOMMES, P.; WEISER, T.; HUBSCHER, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **FASEB Journal**. v.4, n.8, p.2528-2532, 1990.

GAWOR, J.P.; REITER, A.M.; JODKOWSKA, K.; KURSKI, G.; WOJTACKI, M.P.; KUREK, A. Influence of diet on oral health in cats and dogs. **Journal of Nutrition**. v.135, n.7, p.2021S-2023S, 2006.

GIOSSO, M.A. **Odontologia veterinária para o clínico de pequenos animais**. 5.ed. São Paulo: FMVZ- USP, 2003. 202p.

GIOSSO, M.A.; CARVALHO, G.G. Oral anatomy of the dog and cat. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. São Paulo, v.35 p. 763-780, 2005.

GORREL, C.; RAWLINGS, J.M. The role of a 'dental hygiene chew' in maintaining periodontal health in dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**. v.13, n.1, p.31-34, 1996.

GORREL C.; RAWLINGS, J.M. The role of tooth-brushing and diet in the maintenance of periodontal health in dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**. v.13, p.139-143, 1996.

GORREL, C. **Odontologia em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 240p.

GRASP | EW NUTRITION. **Globigen® Intestinal Care**. Visbek, Germany. 2013.

GRONVOLD, A.R.; L'ABÉE-LUND, T.M.; SORUM, H.; SKANCKE, E.; YANNARELL, A.C.; MACKIE, R.I. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. **FEMS Microbiology Ecology**. v.71, p.313-326, 2010.

HANDL, S.; DOWD, S.; GARCIA-MAZCORRO, J.F.; STEINER, J.M.; SUCHODOLSKI, J.S. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. **FEMS Microbiology Ecology**. v.76, p.301-310, 2011.

HATTA, H.; TSUDA, K.; AKACHI, S.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.57, p.450-454, 1993.

HENNET, P. Nutrición y salud oral en el perro. In: PIBOT, P.; BOURGE, V.; ELLIOTT, D. **Enciclopedia de la Nutrición Clínica Canina**. Royal Canin. 2006. 516p.

HENNET, P.; SERVET, E.; VENET, C. Effectiveness of an oral hygiene chew to reduce dental deposits in small breed dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, v.23, n.1, p.6-12. 2006.

HESS, R.S. **Insulin-secreting islet cell neoplasia**. In: ETTINGER, S.J.; FELDMANN, E.C. Text book of veterinary internal medicine. 7th ed. Philadelphia: W B Saunders, 2010. p. 1779-1782.

HOODA, S.; MINAMOTO, Y.; SUCHODOLSKI, J.S.; SWANSON, K.S. Current state of knowledge: the canine gastrointestinal microbiome. **Animal Health Research Reviews**, v.13, n.1, p.78-88, 2012.

HUSSEIN, H.S., FLICKINGER, E.A., FAHEY JR, G.C. Petfood applications of inulin and oligofructose. **The Journal of Nutrition – American Society for Nutritional Sciences**. p.1454S-1456S, 1999.

INAMURA, T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. **Journal of Periodontology**. v.74, n.1, p.111-118, 2013.

IKEMORI, Y.; PERALTA, R. C.; KUROKI, M.; YOKOYAMA, H.; KODAMA, Y. Research note: avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. **Poultry Science**. v.72, n.12, p.2361-2365, 1993.

JIA, J.; FRANTZ, N.; KHOO, C.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A.; McCARTNEY, A.L. Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhea. **FEMS – Microbiology Ecology**. v.71, p.304-312, 2010.

JOHNSON, M. Mouse antibody isotypes/classes, subclasses and mouse antibody isotyping. **Matr Methods**. v.3, n.152, 2013.

JOURDIAN, G.W.; DEAN, L., ROSEMAN, S. The sialic acids – A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. **The Journal of Biological Chemistry**, v.246, n.2, p. 430–435, 1971.

KALLI, I., LEONTIDES, L.S., MYLONAKIS, M.E., ADAMAMA-MORAITOU, K., RALLIS, T., KOUTINAS, A.F. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.174-178, 2010.

KARLSSON, M., KOLLBERG, H., LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Association**, v.60, p.341-348, 2004.

KIL, D. L.; SWANSON, K. S. Companion animals symposium: Role of microbes in canine and feline health. **Journal of Animal Science**, v.89, p.1498-1505, 2011.

KLEMPERER, F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v.31, p.356-382, 1893.

KORE, K.B.; PATIL, S.S.; PHONBADA, B.T. Gastrointestinal microbial ecology and its health benefits in dogs. **Veterinary World**. v.3, n.3, p.140-141, 2010.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annual Review Food Science Technology**. v.3, p.163-182, 2012.

KIL, D. L.; SWANSON, K. S. Companion animals symposium: Role of microbes in canine and feline health. **Journal of Animal Science**. v.89, p.1498-1505, 2011.

KITSIS, M. Avaliação de complicações pulmonares em cães com sepse grave submetidos à terapia intensiva. **Dissertação (Mestrado) – Universidade de São**

Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010. 96p.

KLEMPERER, F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v.31, p.356-382, 1893.

KUZMUK, K.N.; SWANSON, K.S.; TAPPENDEN, K.A.; SCHOOK, L.B.; FAHEY JR, G.C. Diet and age affect intestinal morphology and large bowel fermentative end-product concentrations in senior and young adult dogs. **Journal of Nutrition**. v.135, p.1940-1945, 2005.

LAMM, C.G., REZABEK, G.B. Parvovirus infection in domestic companion animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.38, n.4, p.837-850, 2008.

LARSEN, J. Oral products and dental diseases. **Focus on Nutrition. Compendium: Continuing Education for Veterinarians**. p.E1-E3, 2010.

LARSSON, A.; CARLANDER, D.; WILHELMSSON, M. Immune response in chicken with different amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**. v.10, p.29-36, 1998.

LEE, E.N.; SUNVOO, H.H; MENNINEN, K.; SIM, J.S. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**. v.81, p.632-641, 2002.

LEY, R.E. Obesity and the human microbiome. **Current Opinion in Gastroenterology**. v.26, n.1, p.5-11, 2010.

LÖE, H.; SILNESS, J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. **Acta Odontologica Scandinavica**. v.21, n.6, p.533-551, 1963.

LOGAN, E.I.; BOYCE, E.N. Oral health assessment in dogs: parameters and methods. **Journal of Veterinary Dentistry**. v.11, n.2, p.58-63, 1994.

LOGAN, E.I.; FINNEY, O.; HEFFERREN, J.J. Effects of a dental food on plaque accumulation and gingival health in dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**. v.19, p.15-18, 2002.

LOGAN, E.I.; WIGGS, R.B.; SCHERL, D. CLELAND, P. Periodontal Disease. In: HAND, M.S.; THATCHER, C.D.; REMILLARD, R.L.; ROUDEBUSH, P.; NOVOTNY, B.J. **Small Animal Clinical Nutrition**. 5th ed. Morris Institute, Mark. p.979-991, 2010.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T. Regulation of short-chain fatty acids. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.62, p.67-72, 2003.

MALINEN, E.; KASSINEN, A.; RINTTILÄ, T.; PALVA, A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected fecal bacteria.

Microbiology, v.149, p.269-277, 2003.

MATSUKI, T.; WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; TAKADA, T.; TANAKA, R. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.7220-7228, 2004.

MENDES, R.S.; DE SOUZA, A.P., DA SILVA, R.M.N., BORGES, O.M.M., TORRES, L.M., DANTAS, A.K.F.P. Perfil hematológico e bioquímico de cães com gastroenterite hemorrágica por parvovírus diagnosticados pelo método de imunocromatografia. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p.278-283, 2011.

MENTULA, S.; HARMONINEN, J.; HEIKKILA, M.; WESTERMARCK, E.; RAUTIO, M.; HOUVINEN, P.; KONONEN, E. Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in Beagle dogs. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, p. 4169-4175, 2005.

MICHAEL, A.; MEENATCHISUDARAM, S.; PARAMESWARI, G.; SUBBRAJ, T.; SELVAKUMARAN, R.; RAMALINGAM, S. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. **Indian Journal of Science and Technology**. v.3, n.4, p.468-474, 2010.

MICHELL, P.Q. **Odontologia de Pequenos Animais**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2005. 175p.

MINE, Y.; KOVACS-NOLAN, J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. **Journal of Medicinal Food**. v.5, n.3, p.159-169, 2002.

NADKARNI, M.A.; MATIN, F.E.; JACQUES, N.A.; HUNTER, N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. **Microbiology**, v.148, n.1, p.257-266, 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. In: **Nutrient Requirements of Dogs**. National Academy Press. Washington, 2006. p.428.

NGUYEN, S.V., UMEDA, K., YOKOYAMA, H., TOHYA, Y., KODAMA, Y. Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, p.62-64, 2006.

NILSSON, E.; LARSSON, A. Stability of chicken IgY antibodies freeze-dried in the presence of lactose, sucrose and trehalose. **The Journal of Poultry Science**, v.44, p.58-62, 2007.

NISHIYAMA, S.A.B.; SENHORINHO, G.N.A.; GIOSO, M.A.; AVILA-CAMPOS, M.J. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens of dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p.23-28, 2007.

OTANI, H.; MATSUMOTO, K.; SAEKI, A.; HOSONO, A. Comparative studies on properties of hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**. v.24, p.152-158, 1991.

PANDIT, N.; CHANGELA, R.; BALI, D.; TIKOO, P.; GUGNANI, S. *Porphyromonas gingivalis*: Its virulence and vaccine. **Journal of the International Clinical Dental Research Organization**. v.7, n.1, p.51-58, 2015.

PAIVA, A.C.; SAAD, F.M.O.B.; LEITE, C.A.L.; DUARTE, A.; PEREIRA, D.A.R.; JARDIM, C.A.C. Eficácia dos coadjuvantes de higiene bucal utilizados na alimentação de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.59, n.5, p.1177-1183, 2007.

PANASEVICH, M.R.; KERR, K.R.; DILGER, R.N.; FAHEY JR, G.C.; GUÉRIN-DEREMAUX, L.; LYNCH, G.L.; WILS, D.; SUCHODOLSKI, J.S.; STEINER, J.M.; DOWD, S.E.; SWANSON, K.S. Modulation of the faecal microbiome of healthy adult dogs by inclusion of potato fibre in the diet. **British Journal of Nutrition**. p.1-9, 2014.

PANDIT, N.; CHANGELA, R.; BALI, D.; TIKOO, P.; GUGNANI, S. *Porphyromonas gingivalis*: Its virulence and vaccine. **Journal of the International Clinical Dental Research Organization**. v.7, n.1, p.51-58, 2015.

PERFECTO, D.R.; NAKATA, H.M.; CADILLO, H.M. *Porphyromonas gingivalis*: Patógeno predominante em la periodontitis crónica. **Odontología Sanmarquina**. v.14, n.1, p.34-38, 2011.

PINNA, C.; BIAGI, G. The utilization of prebiotics and synbiotics in dogs. **Italian Journal of Animal Science**. v.13, p. 169-178, 2014.

POKOROVÁ, D.; FRANZ, J.; STEPÁNEK, J. The use of egg yolk immunoglobulin in the diagnostics of canine parvovirus infections. **Veterinární Medicína**. v.45, n.2, p.49-54, 2000.

RAHMAN, A.K.M.S.; IBRAHIM, E.M.; ISODA, R.; UMEDA, K.; NGUYEN, V.S.; KODAMA, Y. Effect of passive immunization by anti-gingipain IgY on periodontal health of dogs. **Veterinary Science Development**. v.1, n.8, p.35-39, 2011.

RAHMAN, S.; NGUYEN, S.V.; ICATLO JR, F.C.; UMEDA, K.; KODAMA, Y. Oral passive IgY-based immunotherapeutics. A novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. v.9, n.5, p.1039-1048, 2013.

REINOLDES, A. Avaliação dos níveis de glicose, insulina, cortisol e glucagon em cães com sepse grave submetidos ao tratamento intensivo. **Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia**, São Paulo, 2011. 101p.

RIGGIO, M.P.; LENNON, A.; TAYLOR, D.J.; BENNET, D. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. **Veterinary Microbiology**. v.150, p.394-400, 2011.

RINTTILÄ, T. KASSINEN, A.; MALINEN, E.; KROGIUS, L.; PALVA, A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in fecal samples by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.1166-1177, 2004.

RUSSEL, W.M.S.; BURCH, R.L. **The principles of humane experimental technique**. London, UK: Methuen. 1959. 238p.

RUTHERFURD, S.M.; CHUNG, T.K.; MOUGHAN, P.J. The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken. **British Poultry Science**, v.43, p.598–606, 2002.

SCHADE, R.; CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H.R. Chicken egg-yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Atla*, v.33, p.1-26, 2005.

SILNESS J, LÖE H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.22, p.121-135, 1964.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; SANO, K.; HASHIMOTO, K.; OZEKI, M.; TSUDA, K.; HATTA, H. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.56, p.270–274, 1992.

SHIMIZU, Y.; IWASAKI, T.; TAJIMA, T.; YUBA, E.; KONO, K.; WATARAI, S. Induction of antibody response in the oral cavity of dogs following intraocular (eye drop) immunization with *Porphyromonas gingivalis* cell lysate incorporated in pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v.79, n.2, p.290-298, 2017.

SCHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; HASHIMOTO, K; SUZUKI, T. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sucker concentrations. **Journal of Food Science**. v.59, p.763-772, 1994.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**. v.25, p.134-44, 1998.

SONG, Y.; LIU, C.; FINEGOLD, S.M. Real-Time PCR quantification of Clostridia in feces of autistic children. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.11, p.6459-6465, 2004.

STAINKI, D.R. Microbiota ou Flora Normal. Centro de Ciências da Saúde – CCS. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. **Universidade Federal de Santa Maria**. 2012.

STROTTMANN, D.M.; SCORTEGAGNA, G.; KREUTZ, L.C.; BARCELLOS, L.J.G., FRANDOLOSO, R., ANZILIERO, D. Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.38, n.2, p.400-405, 2008.

SUCHODOLSKI, J.S. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. v.41, p.261-272, 2011.

SUCHODOLSKI, J.S.; MARKEL, M.E.; GARCIA-MAZCORRO, J.F.; UNTERER, S.; HEILMANN, R.M.; DOWD, S.E.; KACHROO, P.; IVANOV, I.; MINAMOTO, Y.; DILMAN, E.M.; STEINER, J.M.; COOK, A.K.; TORESSON, L. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. **PLoS One**. v.7, n.12, p.1-13, 2012.

SUGITA-KONISHI, Y., SHIBATA, K., YUN, S.S., HARA-KUDO, Y., YAMAGUCHI, K., KUMAGAI, S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 60, n. 5, p. 886-888, 1996.

SUNWOO, H.H.; LEE, E.N.; MENNINEN, K.; SURESH, M.R.; SIM, J.S. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* 0157:H7. **Journal of Food Science**. v.67, p.1486-1494, 2002.

SWANSON, K.S.; DOWD, S.E.; SUCHODOLSKI, J.S.; MIDDELBOSS, I.S.; VESTER, B.M.; BARRY, K.A.; NELSON, K.E.; TORRALBA, M.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; CANN, I.K.O.; WHITE, B.A.; FAHEY JR, G.C. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. **The ISME Journal – International Society for Microbial Ecology**. v.5, p.639-649, 2011.

TEIXEIRA, S.; MATTARAZO, F.; FERES, M.; FIGUEIREDO, L.; DE FAVERI, M.; SIMIONATO, M.; MAYER, M.P. Quantification of Porphyromonas gingivalis and fimA genotypes in smoker chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**. v.36, n.6, p.482-487, 2009.

TELHADO, J.; MAGANIN JUNIOR, A.; DIELE, C.A.; MARINHO, M.S. Incidência de cálculo dentário e doença periodontal em cães da raça pastor alemão. **Ciência Animal Brasileira**. v.5, n.2, p.99-104, 2004.

TESAR, D.B.; CHEUNG, E.J.; BJORKMAN, P.J. The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. **Molecular Biology of the Cell**. v.19, n.4, p.1587-1593, 2008.

TINI, M.; JEWELL, U.R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.131, p.569-574, 2002.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.; GORDON, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**. v.444, p.1027-1031, 2006.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. **Nature**. v.449, p.8004-810, 2007.

WILSON, S., ILLAMBAS, J., SIEDEK, E., STIRLING, C., THOMAS, A., PLEVOVÁ, E., STURE, G., SALT, J. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralizing antibody responses to CPV-2a and CPV-2c. **Vaccine**, v.32, p. 5420-5424, 2014.

WHYTE, A.; BONASTRE, C.; MONTEAGUDO, L.V.; LES, F.; OBON, J. Canine stage 1 periodontal disease: A latent pathology. **The Veterinary Journal**. v.201, p.118-120, 2014.

WONG, J.M.W.; DE SOUZA, R.; KENDALL, C.W.C.; EMAM, A.; JENKINS, D.J.A. Colonic Health: Fermentation and short chain fatty acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**. v.40, n.3, p.235-243, 2006.

XU, Y.; LI, X.; JIN, L.; ZHEN, Y.; LU, Y.; LI, S.; YOU, J.; WANG, L. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. **Biotechnology advances**. v.29, p.860–868, 2011.

YAMKA, R.M., HARMON, D.L., SCHOENHERR, W.D., KHOO, C., GROSS, K.L., DAVIDSON, S.J., JOSHI, D.K., In vivo measurement of flatulence and nutrient digestibility in dogs fed poultry by-product meal conventional soya meal, and low-oligosaccharide low-phytate soya meal. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, p.88-94, 2006.

YOKOYAMA, K.; SUGANO, N.; SHIMADA, T.; RAHMAN, A.K.M.S.; OSHIKAWA, M.; ITO, K. Activity of anti-*Porphyromonas gingivalis* egg yolk antibody against gingipains *in vitro*. **Oral Microbiology Immunology**. v.22, p.352-355, 2007a.

YOKOYAMA, K.; SUGANO, N.; SHIMADA, T.; RAHMAN, A.K.M.S.; IBRAHIM, E.M.; ISODA, R.; UMEDA, K.; NGUYEN, V.S.; KODAMA, Y.; ITO, K. Effects of egg yolk antibody against *Porphyromonas gingivalis* gingipains in periodontitis patients. **Journal of Oral Science**. v.49, n.3, p.201-206, 2007b.

ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**. v.8, n.8, p.364-371, 2003.